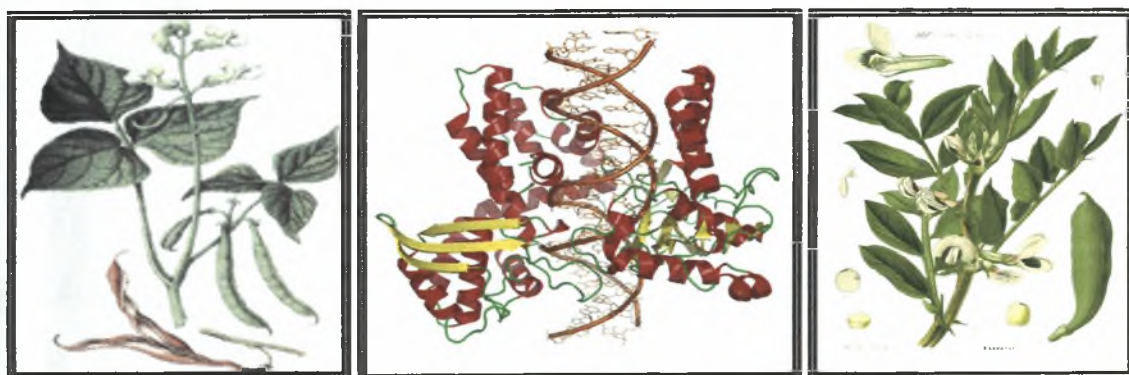


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Διπλωματική Εργασία**

***Επίδραση εκχυλισμάτων και κλασμάτων καθαρών μορίων  
από ψυχανθή στην δράση της τοποϊσομεράσης I***



***Επιμέλεια Εργασίας: Μπούρου Γεωργία***

***Επιβλέπων καθηγητής: Δ. Κουρέτας***

**Λάρισα 2008**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 7043/1

Ημερ. Εισ.: 27-03-2009

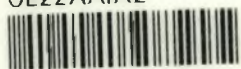
Δωρεά: Π.Θ.

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2008

ΜΠΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087325

## ***Στοιχεία Πτυχιακής Εργασίας***

Το πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας με τίτλο, ***«Επίδραση εκχυλισμάτων και κλασμάτων καθαρών μορίων από ψυχανθή στην δράση της τοποϊσομεράσης Ι»*** πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του καθηγητή Δ. Κουρέτα.

Μέλη τριμελούς επιτροπής: Δ. Κουρέτας  
Δ. Κομιώτης  
Μ. Κοντού

## ***Ευχαριστίες***

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ανάθεση της πτυχιακής μου εργασίας στο εργαστήριο του καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου πρόσφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις για την περαιτέρω πορεία μου.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα Χρύσα Σπανού για την επίβλεψη μου κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους, για την καθοδήγηση και την υπομονή καθώς και για την βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της συγγραφής της πτυχιακής εργασίας. Ακόμη θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την προθυμία της να άπαντα σε όλες τις απορίες μου καθώς και για τη συμβολή της στις νέες γνώσεις που αποκόμισα κατά τη διάρκεια διεκπεραίωσης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο καθώς και για την πολύ καλή συνεργασία.

## Περιεχόμενα

<b>Περίληψη</b>	<b>10</b>
<b>1. Εισαγωγή</b>	<b>11</b>
1.1 Ψυχανθή	11
1.2 Πολυφαινόλες	14
1.2.1 Φαινολικά οξέα	14
1.2.2 Φλαβονοειδή	15
1.2.3 Στιλβένια	17
1.2.4 Λιγνάνες	17
1.3 Χημειοπροστασία και καρκίνος	18
1.3.1 Καρκίνος	18
1.3.2 Χημειοπροστασία	19
1.4 Πολυφαινόλες και χημειοπροστασία	21
1.4.1 Αντικαρκινική δράση	21
1.4.2 Αντιοξειδωτική δράση	22
1.4.2.1 Ελεύθερες ρίζες	22
1.4.2.2 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες	23
1.5 Τοποϊσομεράσες	25
1.5.1 DNA τοποϊσομεράση I	26
1.5.1.1 Δομή του ενζύμου	26
1.5.1.2 Μηχανισμός δράσης	27
1.5.2 DNA Τοποϊσομεράση II	28
1.5.2.1 Μηχανισμός δράσης	28
1.5.3 Τοποϊσομεράσες και καρκίνος	30
1.5.4 Αναστολείς των τοποϊσομερασών	30
1.5.5 Πολυφαινόλες ως αναστολείς τοποϊσομερασών	36
1.6 Σκοπός	36
<b>2. Υλικά και μέθοδοι</b>	<b>40</b>
2.1 Υλικά	40
2.1.1 Εκχυλίσματα και κλάσματα καθαρών μορίων	40
2.1.2 Πλασμιδιακό DNA	41
2.1.3 Απομόνωση πλασμιδίου	41
2.1.4 Topoisomerase I relaxation assay	41
2.2 Μέθοδοι	42

2.2.1	Αρχή της μεθόδου	42
2.2.2	Πειραματική διαδικασία	43
2.2.2.1	Απομόνωση πλασμιδίου	43
2.2.2.2	Topoisomerase relaxation assay	44
2.2.3	Υπολογισμοί	45
<b>3.</b>	<b>Αποτελέσματα</b>	<b>46</b>
3.1	Επίδραση στη δράση της τοποϊσομεράσης I 11 υδατικών εκχυλισμάτων φυτών της οικογένειας Leguminosae	46
3.2	Επίδραση στη δράση της τοποϊσομεράσης I 2 μεθανολικών εκχυλισμάτων από τα φυτά <i>Vicia faba</i> και <i>Lotus edulis</i>	46
3.3	Επίδραση στη δράση της τοποϊσομεράσης I 10 κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό <i>Vicia faba</i>	47
3.4	Επίδραση στη δράση της τοποϊσομεράσης I 4 κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό <i>Lotus edulis</i>	47
<b>4.</b>	<b>Συζήτηση</b>	<b>66</b>
	<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>70</b>
	<b>Παράρτημα</b>	<b>74</b>

## Περιεχόμενα Εικόνων

<b>Εικόνα 1:</b> Διάφορα όσπρια που καταναλώνονται παγκοσμίως	12
<b>Εικόνα 2:</b> Πυραμίδα Μεσογειακής διατροφής	13
<b>Εικόνα 3:</b> Χημική δομή υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκιναμικών οξέων	14
<b>Εικόνα 4:</b> Χημική δομή φλαβονοειδών	15
<b>Εικόνα 5:</b> Χημική δομή της ρεσβερατρόλης	17
<b>Εικόνα 6:</b> Χημική δομή φυτικών λιγνάνων και των ζωικών παραγώγων τους	18
<b>Εικόνα 7:</b> Σημεία δράσης χημειοπροστατευτικών παραγόντων	20
<b>Εικόνα 8:</b> Κλινικές καταστάσεις με τις οποίες έχει βρεθεί ότι σχετίζονται οι ROS	23
<b>Εικόνα 9:</b> Το ένζυμο της τοποϊσομεράσης I γύρω από το DNA	24
<b>Εικόνα 10:</b> Κατάλυση παροδικού σπασίματος στο DNA από τοποϊσομεράσες	26
<b>Εικόνα 11:</b> Οργάνωση των περιοχών της τοποϊσομεράσης I	27
<b>Εικόνα 12:</b> Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης I	27
<b>Εικόνα 13:</b> Αριστερά: Πρότυπο δράσης της τοποϊσομεράσης IA Δεξιά: Πρότυπο δράσης της τοποϊσομεράσης IB	28
<b>Εικόνα 14:</b> Πρότυπο της κατάλυσης από την τοποϊσομεράση II	29
<b>Εικόνα 15:</b> Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης II	29
<b>Εικόνα 16:</b> Τρόποι με τους οποίους δημιουργείται το σύμπλοκο τοποϊσομεράση-DNA-φάρμακο	31
<b>Εικόνα 17:</b> Μηχανισμός κυτταροτοξικότητας από τα λεγόμενα poisons των τοποϊσομερασών I και II	31
<b>Εικόνα 18:</b> Χημική δομή δύο μορφών του EMD	32
<b>Εικόνα 19:</b> Μηχανισμός δράσης του EMD	32
<b>Εικόνα 20:</b> Χημική δομή της καμπτοθεκίνης	32
<b>Εικόνα 21:</b> Μηχανισμός δράσης καμπτοθεκίνης	33
<b>Εικόνα 22:</b> Χημική δομή της κερκετίνης	33
<b>Εικόνα 23:</b> Μηχανισμός δράσης κερκετίνης στην τοποϊσομεράση I	33
<b>Εικόνα 24:</b> Χημική δομή της λουτεΐνης όπου R1=H	34
<b>Εικόνα 25:</b> Χημική δομή της δοξορουβικίνης (doxorubicin)	34
<b>Εικόνα 26:</b> Χημική δομή της ελλiptικίνης (ellipticine)	34
<b>Εικόνα 27:</b> Χημική δομή της αμσακρίνης (amsacrine)	35
<b>Εικόνα 28:</b> Χημική δομή της γενιστεΐνης (genistein)	35

<b>Εικόνα 29:</b> Χημική δομή της ετοποσίδης (etoposide)	35
<b>Εικόνα 30:</b> <i>Phaseolus vulgaris</i> (Σπόροι)	37
<b>Εικόνα 31:</b> <i>Phaseolus vulgaris</i> (Φυτό και καρποί)	37
<b>Εικόνα 32:</b> <i>Lathyrus laxiflorus</i>	37
<b>Εικόνα 33:</b> <i>Lathyrus clymenum</i>	37
<b>Εικόνα 34:</b> <i>Lens culinaris</i>	38
<b>Εικόνα 35:</b> <i>Lupinus albus</i>	38
<b>Εικόνα 36:</b> <i>Vicia faba</i> (Φυτό)	39
<b>Εικόνα 37:</b> <i>Vicia faba</i> (Σπόροι)	39
<b>Εικόνα 38:</b> <i>Lotus edulis</i>	39
<b>Εικόνα 39:</b> Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA	42
<b>Εικόνα 40:</b> Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος από πόα <i>Lathyrus laxiflorus</i> (100, 200, 400, 800 µg/ml ) στη δράση της τοποϊσομεράσης I	49
<b>Εικόνα 41:</b> Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος από πόα <i>Lathyrus laxiflorus</i> (5, 20, 50 µg/ml) στη δράση της τοποϊσομεράσης I	49
<b>Εικόνα 42:</b> Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος από πόα <i>Vicia faba</i> στη δράση της τοποϊσομεράσης I	50
<b>Εικόνα 43:</b> Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος από σπέρματα <i>Phaseolus vulgaris</i> στη δράση της τοποϊσομεράσης I	50
<b>Εικόνα 44:</b> Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος από πόα <i>Phaseolus vulgaris</i> στη δράση της τοποϊσομεράσης I	50
<b>Εικόνα 45:</b> Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος από σπέρματα <i>Lathyrus clymenum</i> στη δράση της τοποϊσομεράσης I	51
<b>Εικόνα 46:</b> Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων από σπέρματα και πόα <i>Lupinus albus</i> στη δράση της τοποϊσομεράσης I	51
<b>Εικόνα 47:</b> Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων από πόα και σπέρματα <i>Lotus edulis</i> στη δράση της τοποϊσομεράσης I	51
<b>Εικόνα 48:</b> Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων από πόα και σπέρματα <i>Lens culinaris</i> στη δράση της τοποϊσομεράσης I	52
<b>Εικόνα 49:</b> Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος από πόα <i>Lotus edulis</i> στη δράση της τοποϊσομεράσης I	53
<b>Εικόνα 50:</b> Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος από πόα <i>Vicia faba</i> στη δράση της τοποϊσομεράσης I	53

<b>Εικόνα 51:</b> Χημικές δομές φαινολικών ενώσεων	55
<b>Εικόνα 52:</b> Επίδραση των κλασμάτων καθαρών μορίων Vfm 92-97 και Vfm 135-137 στη δράση της τοποϊσομεράσης I	56
<b>Εικόνα 53:</b> Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου Vfm 115 στη δράση της τοποϊσομεράσης I	57
<b>Εικόνα 54:</b> Επίδραση των κλασμάτων καθαρών μορίων Vfm 32-34 και Vfm 76-81 στη δράση της τοποϊσομεράσης I	58
<b>Εικόνα 55:</b> Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου Vfm 155-160 στη δράση της τοποϊσομεράσης I	59
<b>Εικόνα 56:</b> Επίδραση των κλασμάτων καθαρών μορίων Vfm 6-9 και Vfm 13-15 στη δράση της τοποϊσομεράσης I	60
<b>Εικόνα 57:</b> Επίδραση των κλασμάτων καθαρών μορίων Vfm 25-28 και Vfm 171-176 στη δράση της τοποϊσομεράσης I	61
<b>Εικόνα 58:</b> Χημικές δομές μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων	62
<b>Εικόνα 59:</b> Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου Le C6 στη δράση της τοποϊσομεράσης I	63
<b>Εικόνα 60:</b> Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου Le C2 στη δράση της τοποϊσομεράσης I	64
<b>Εικόνα 61:</b> Επίδραση των κλασμάτων καθαρών μορίων Le D3 και Le D6 στη δράση της τοποϊσομεράσης I	65



## Περιεχόμενα Πινάκων

<b>Πίνακας 1:</b> Υδατικά εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας <i>Leguminosae</i>	40
<b>Πίνακας 2:</b> Εκχυλίσματα και κλάσματα καθαρών μορίων από τα φυτά <i>Vicia faba</i> και <i>Lotus edulis</i>	40
<b>Πίνακας 3:</b> Δείγματα για μελέτη της δράσης των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων καθαρών μορίων	44
<b>Πίνακας 4:</b> Ποσοστά % αναστολής/επαγωγής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από υδατικά εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας <i>Leguminosae</i>	48
<b>Πίνακας 5:</b> Ποσοστά % αναστολής/επαγωγής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από μεθανολικά εκχυλίσματα από τα φυτά <i>Vicia faba</i> και <i>Lotus edulis</i>	53
<b>Πίνακας 6:</b> Ποσοστά % αναστολής/επαγωγής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πύας του φυτού <i>Vicia faba</i>	54
<b>Πίνακας 7:</b> Αναλογία φαινολικών ενώσεων σε κάθε κλάσμα	54
<b>Πίνακας 8:</b> Ποσοστά % αναστολής/επαγωγής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πύας του φυτού <i>Lotus edulis</i>	62
<b>Πίνακας 9:</b> Φαινολικές ενώσεις σε κάθε κλάσμα	62

## Περιεχόμενα Γραφημάτων

<b>Γράφημα 1:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από το υδατ. Εκ. <i>Lathyrus laxiflorus</i> (100, 200, 400, 800 µg/ml)	49
<b>Γράφημα 2:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από το υδατ. Εκ. <i>Lathyrus laxiflorus</i> (5, 20, 50 µg/ml)	49
<b>Γράφημα 3:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από το υδατ. Εκ. <i>Vicia faba</i> (100, 200, 400, 800 µg/ml)	50
<b>Γράφημα 4:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από τα Μεθαν. Εκ. <i>Vicia faba</i> και <i>Lotus edulis</i> (100, 200, 400, 800 µg/ml)	53
<b>Γράφημα 5:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από το καθαρό μόριο Vfm 92-97	56
<b>Γράφημα 6:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από το καθαρό μόριο Vfm 135-137	56
<b>Γράφημα 7:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από το καθαρό μόριο Vfm 115	57
<b>Γράφημα 8:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από το καθαρό μόριο Vfm 32-34	58
<b>Γράφημα 9:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από το καθαρό μόριο Vfm 76-81	58
<b>Γράφημα 10:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από το καθαρό μόριο Vfm 155-160	59
<b>Γράφημα 11:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από το καθαρό μόριο Vfm 6-9	60
<b>Γράφημα 12:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από το καθαρό μόριο Vfm 13-15	60
<b>Γράφημα 13:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από το καθαρό μόριο Vfm 25-28	61
<b>Γράφημα 14:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από το καθαρό μόριο Vfm 171-176	61
<b>Γράφημα 15:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από το καθαρό μόριο Le C6	63
<b>Γράφημα 16:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από το καθαρό μόριο Le C2	64
<b>Γράφημα 17:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από το καθαρό μόριο Le D3	65
<b>Γράφημα 18:</b> Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης Ι από το καθαρό μόριο Le D6	65

## Περίληψη

Τα ψυχανθή αποτελούν μια μεγάλη ομάδα δικοτυλήδονων φυτών που ανήκουν στην λεγόμενη οικογένεια *Leguminosae*. Οι καρποί των ψυχανθών που καταναλώνονται ως τρόφιμα χαρακτηρίζονται ως όσπρια (pulses), και είναι πλούσια σε ουσίες που θεωρούνται ότι έχουν ωφέλιμες επιδράσεις στην υγεία. Οι πολυφαινολικές ουσίες που περιέχονται στα όσπρια των ψυχανθών έχει βρεθεί ότι διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην χημειοπροστασία, καθώς εμφανίζουν αντικαρκινικές ιδιότητες και έτσι μπορούν να δράσουν μέσω της διατροφής ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες. Οι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν οι ουσίες αυτές δεν είναι πλήρως γνωστοί. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν διάφορα φυτικά εκχυλίσματα που προέρχονται από μοναδικά ελληνικά φυτά ψυχανθών της οικογένειας *Leguminosae*. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παρατήρηση της δράσης αυτών των εκχυλισμάτων και κλάσμάτων τους πλούσιων σε πολυφαινολικές ενώσεις στη δράση της τοποϊσομεράσης I. Η τοποϊσομεράση I αποτελεί ένζυμο σημαντικό για πολλές κυτταρικές διεργασίες ενώ εμφανίζεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις σε καρκινικά κύτταρα. Μελετήθηκαν συνολικά 11 υδατικά εκχυλίσματα φυτών, 2 μεθανολικά εκχυλίσματα από τα φυτά *Vicia Faba* και *Lotus Edulis*, 10 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό *Vicia Faba* και 4 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό *Lotus Edulis*. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι εκχυλίσματα προερχόμενα από τα φυτά *Vicia Faba*, *Lathyrus Laxiflorus* και *Lotus Edulis*, καθώς και κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από τα φυτά *Vicia Faba* και *Lotus Edulis* παρουσιάζουν ανασταλτική δράση κυρίως στην τοποϊσομεράση I. Η ικανότητα τόσο των εκχυλισμάτων όσο και των περιεχόμενων δραστικών ουσιών τους να δρουν ως αναστολείς της τοποϊσομεράσης I τα καθιστά ως πιθανούς αντικαρκινικούς παράγοντες, δημιουργώντας μελλοντικές προοπτικές στην χημειοθεραπεία του καρκίνου.

## Συντομογραφίες

- ROS: Reactive Oxygen Species, (Δραστικές Μορφές Οξυγόνου)
- ABS: Absorbance

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Ψυχανθή

Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια φυτών *Leguminosae*, που αποτελεί ομάδα δικοτυλήδων φυτών και περιλαμβάνουν περισσότερα από 18.000 είδη. Η ονομασία τους προέρχεται από το γεγονός ότι τα τυπικά τους φρούτα (legumes) είναι τα σπέρματα των ψυχανθών. Η οικογένεια φυτών *Leguminosae* ανήκει σε μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες ανθοφόρων φυτών και ταξινομείται σε τρεις υποοικογένειες: τη *Mimosoideae*, τη *Caesalpinioideae* και τη *Faboideae* (B.S. Kurlovich and S.I. Repeyev, 1995). Μορφολογικά τα ψυχανθή χαρακτηρίζονται από ισχυρό πασαλώδες ριζικό σύστημα με πολυάριθμες διακλαδώσεις. Τόσο στην κύρια ρίζα όσο και στις διακλαδώσεις παρατηρούνται εξογκώσεις που ονομάζονται φυμάτια τα οποία σχηματίζονται από τη συμβιωτική δράση των αζωτοβακτηρίων του γένους *Rhizobium* ή *Bradyrhizobium*. Τα αζωτοβακτήρια έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο και να το αποδίδουν στα φυτά σε άμεσα αφομοιώσιμη μορφή ([www.minagric.gr](http://www.minagric.gr)).

Η μορφολογία των φυτών των ψυχανθών είναι χαρακτηριστική. Οι βλαστοί φέρουν διακλαδώσεις και μπορεί να είναι λείοι ή τριχωτοί με όρθια, έρπουσα ή αναρριχώμενη ανάπτυξη. Τα φύλλα αποτελούνται από τρία ή περισσότερα φυλλάρια που διαφέρουν σε ύψη, σχήμα, αριθμό και μέγεθος ανάλογα με το είδος και την ποικιλία. Οι ταξιανθίες είναι επάκριες ή μασχαλιαίες και τα άνθη τους είναι διατεταγμένα σε κεφαλές ή βότρυς. Το άνθος περιλαμβάνει ένα σωληνοειδή κάλυκα που καταλήγει σε πέντε ανισομήκη ή σχεδόν ισομήκη δόντια και στεφάνη που αποτελείται από πέντε πέταλα τριών διαφορετικών ειδών. Το μεγαλύτερο από τα πέντε πέταλα είναι ο πέτασος, δύο όμοια μεταξύ τους που ονομάζονται πτέρυγες και δύο ενωμένα μεταξύ τους που αποτελούν την τροπίδα. Στο εσωτερικό της τροπίδας βρίσκονται δέκα στήμονες των οποίων τα νήματα μπορεί να είναι ενωμένα μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα σωλήνα που περιβάλλει τον ύπερο ή ο ένας να είναι ελεύθερος και οι εννέα ενωμένοι. Ο ύπερος αποτελείται από ένα καρπόφυλλο το οποίο σχηματίζει ένα στύλο που καταλήγει σε ένα μόνο στίγμα. Το καρπόφυλλο αποτελείται από μία ωοθήκη που περικλείει μία ή περισσότερες σπερματικές βλάστες (ωάρια). Ο καρπός είναι λοβός με δύο τοιχώματα, τα οποία συνδέονται με δύο ραφές. Ο λοβός ποικίλει σε σχήμα, υφή, χρώμα, μέγεθος και στο εσωτερικό του βρίσκονται ένας ή περισσότεροι σπόροι ενωμένοι με το λοβό στο σημείο του οφθαλμού (μάτι ή hilum) μέσω του ομφαλικού ιμάντα ([www.minagric.gr](http://www.minagric.gr)).

Από τα ψυχανθή καταναλώνονται ως τρόφιμα κυρίως τα σπέρματά τους όπως είναι τα φασόλια, η σόγια, τα κουκιά, τα μπιζέλια, η φακή καθώς και τα ρεβίθια. Οι καρποί των ψυχανθών που καταναλώνονται ως τρόφιμα χαρακτηρίζονται ως όσπρια (pulses) (Εικόνα 1) (Duranti, 2006). Η ιστορία των οσπρίων είναι συνυφασμένη με αυτή του ανθρώπινου πολιτισμού, εμφανίστηκαν αρχικά στην Ασία, στην Αμερική και κατόπιν στην Ευρώπη όπου και ήταν βασικά προϊόντα στην διατροφή, απαραίτητα σαν συμπληρώματα πρωτεϊνών όπου δεν υπήρχε αρκετό κρέας (B.S. Kurlovich and S.I. Ropyev, 1995). Ακόμη η κατανάλωση οσπρίων αποτελεί σημαντικό κομμάτι και της ελληνικής διατροφής από τα πρώιμα στάδια της εξέλιξης του ανθρώπινου πολιτισμού μέχρι και σήμερα (A. Simopoulos, 2007).

Τα όσπρια αποτελούν σημαντική πηγή πρωτεϊνών και για αυτό αποτελούν σημαντικό κομμάτι στην διατροφή. Έχει αποδειχθεί ότι οι πρωτεΐνες των τροφίμων δεν είναι μόνο πηγή εποικοδομητικών και ενεργητικών αμινοξέων αλλά μπορούν να παίζουν ένα βιο-ενεργητικό ρόλο οι ίδιες είτε αποτελώντας πρόδρομους βιολογικών ενεργών πεπτιδίων συμμετέχοντας έτσι σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες. Οι πρωτεΐνες των οσπρίων είναι αρκετά ωφέλιμες για την υγεία αφού έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να έχουν ευεργετικές επιδράσεις σε πολλές ασθένειες όπως σε καρδιαγγειακές παθήσεις, διαβήτη, παθήσεις του γαστρεντερικού σωλήνα, παχυσαρκία κ.α. (Duranti, 2006). Εκτός από το πλήθος πρωτεϊνών τα όσπρια έχουν χαμηλά λιπαρά και Na, χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη ενώ είναι πηγή φυτικών ινών, ανόργανων στοιχείων όπως Ca, Fe, K, Mg, Zn, ιχνοστοιχείων και ποικίλων φυτοχημικών ουσιών όπως η σημαντική κατηγορία των πολυφαινόλων με ποικίλες θετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου (Z. Madar, A. Stark, 2002).



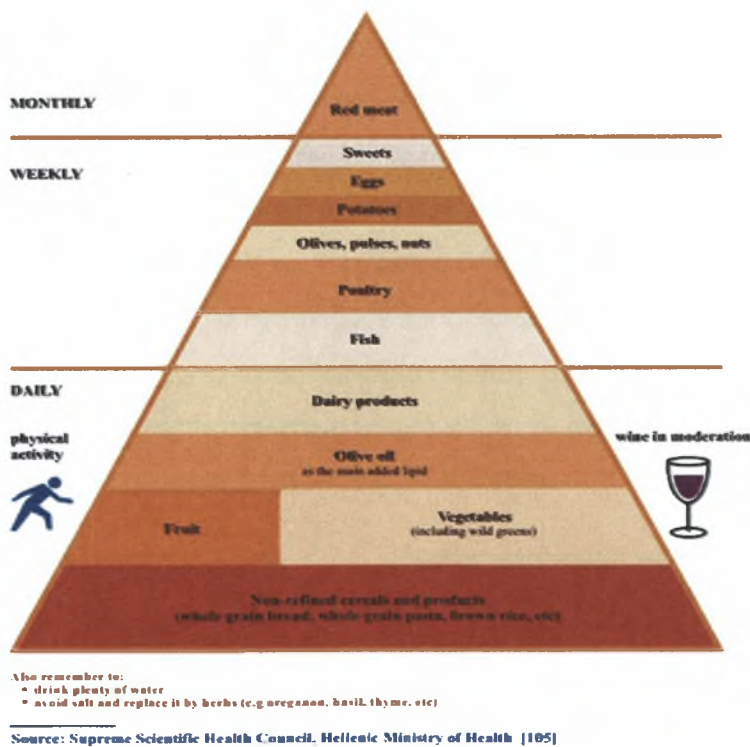
**Εικόνα 1:** Διάφορα όσπρια που καταναλώνονται παγκοσμίως

Ακόμη, τα όσπρια αποτελούν σημαντικό τμήμα της μεσογειακής διατροφής η οποία περιλαμβάνει υψηλή κατανάλωση φρούτων, λαχανικών, ελαιόλαδου, δημητριακών, συχνή κατανάλωση ψαριού, μέτρια κατανάλωση αλκοόλ κυρίως κρασιού κατά τη διάρκεια των γευμάτων και γαλακτοκομικών προϊόντων και μειωμένη κατανάλωση κρεάτων και ζωικών προϊόντων (Εικόνα 2). Έτσι η μεσογειακή διατροφή είναι πλούσια σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, φυτικές ίνες, βιταμίνες, ανόργανα συστατικά και φυσικά αντιοξειδωτικά. Έχει



παρατηρηθεί ότι σχετίζεται με τη μείωση της θνησιμότητας αφού τα τρόφιμα που περιλαμβάνονται σε αυτή είναι καλή πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών και εμφανίζουν αρκετά οφέλη σε ασθένειες όπως καρδιακές παθήσεις και διάφορες μορφές καρκίνου (E. Vasilopoulou et al., 2005, A. Simopoulos, 2007).

Ωστόσο, τα όσπρια περιέχουν και κάποια μη θρεπτικά συστατικά όπως αναστολείς τρυψίνης, φυτικά οξέα, ολιγοσακχαρίτες και σαπωνίνες. Οι αναστολείς τρυψίνης των οσπρίων σχετίζονται με την πρωτεϊνική πέψη και σε κάποια είδη ζώων προκαλούν παγκρεατική αύξηση και προαγωγή των χημικά επαγόμενων παγκρεατικών όγκων. Οι ουσίες αυτές σε αντίθεση με αυτές τους τις επιβλαβείς δράσεις έχει βρεθεί ότι μπορούν να δρουν και ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Τα φυτικά οξέα πιστεύεται ότι σχετίζονται με τη μείωση του ρίσκου εμφάνισης καρκίνου πιθανόν λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων. Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί ότι τα φυτικά οξέα μειώνουν το ρίσκο εμφάνισης του καρκίνου του εντέρου και ίσως και του καρκίνου του στήθους. Οι ολιγοσακχαρίτες θεωρούνται ότι είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή αερίων έχοντας αρκετά οφέλη στην υγεία αφού προάγουν την υγεία του εντέρου, αυξάνουν τη μακροζωία και μειώνουν το ρίσκο εμφάνισης του καρκίνου του εντέρου. Οι σαπωνίνες παρατηρήθηκε ότι εμφανίζουν αντικαρκινική δράση αναστέλλοντας κατά 2/3 την ανάπτυξη των αζοξυμεθάνιο-επαγόμενων βλαβών στον έντερο (M. Messina, 1999).



Εικόνα 2: Πυραμίδα Μεσογειακής διατροφής

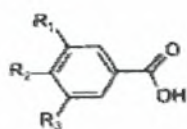
## 1.2 Πολυφαινόλες

Τα φυτά αποτελούν την σημαντικότερη πηγή παραγωγής πολυφαινολικών ενώσεων. Οι πολυφαινόλες δημιουργούνται από τα φυτά για να τα προστατεύουν από το φωτοσυνθετικό στρες, τις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), τους τραυματισμούς και τα φυτοφάγα ζώα. (C.S.Yang et al., 2001). Αντιπροσωπεύουν μια ευρεία τάξη φυτικών ουσιών που έχουν κοινό χαρακτηριστικό έναν αρωματικό δακτύλιο με μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Πρόδρομος των πολυφαινόλων είναι η φαινυλαλανίνη η οποία προκύπτει από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Οι φαινολικές ουσίες μπορούν να χωριστούν σε περισσότερους από 10 τύπους ανάλογα με τη χημική δομή τους. Έτσι οι πιο συνηθισμένοι τύποι στα φυτά είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στιλβένια και οι λιγνάνες (S. Nishenametla and T.Taruscio, 2006). Τροφές πλούσιες σε πολυφαινόλες είναι τα φρούτα, τα λαχανικά, το κρασί, το τσάι, ο καφές, το κακάο, τα δημητριακά, το ελαιόλαδο και τα **όσπρια**. Έχει βρεθεί ότι έχουν αντιοξειδωτική δράση και όταν συμπεριλαμβάνονται στην διατροφή μειώνουν την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου, των καρδιαγγειακών παθήσεων, του διαβήτη, των νευροεκφυλιστικών ασθενειών και της οστεοπόρωσης (A. Scalbert, 2005).

### 1.2.1 Φαινολικά οξέα

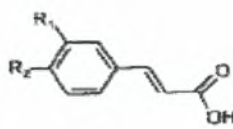
Τα φαινολικά οξέα παράγονται αποκλειστικά στα φυτά. Προέρχονται είτε από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, τα οποία βρίσκονται πιο συχνά σαν απλοί εστέρες με καρβοξυλικά οξέα ή γλυκόζη και περιλαμβάνουν το γαλλικό οξύ, το βανιλικό οξύ, το πρωτοκατεχοϊκό οξύ και το σιριγγικό οξύ, είτε από τα υδροξυκινναμικά οξέα τα οποία βρίσκονται συνήθως με τη μορφή των γλυκοσιδίων και περιλαμβάνουν το p-κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το φερουλικό οξύ (Εικόνα 3). Τα φαινολικά οξέα εμφανίζουν ποικίλες θετικές επιδράσεις καθώς έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν αντικαρκινική και αντιοξειδωτική δράση που οφείλεται στην εξουδετέρωση ενεργών ηλεκτροφίλων και ριζών οξυγόνου καθώς και στην αναστολή του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος (S. Nishenametla and T.Taruscio, 2006).

#### Hydroxybenzoic acids



$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$  : Protocatechoic acid  
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$  : Gallic acid

#### Hydroxycinnamic acids

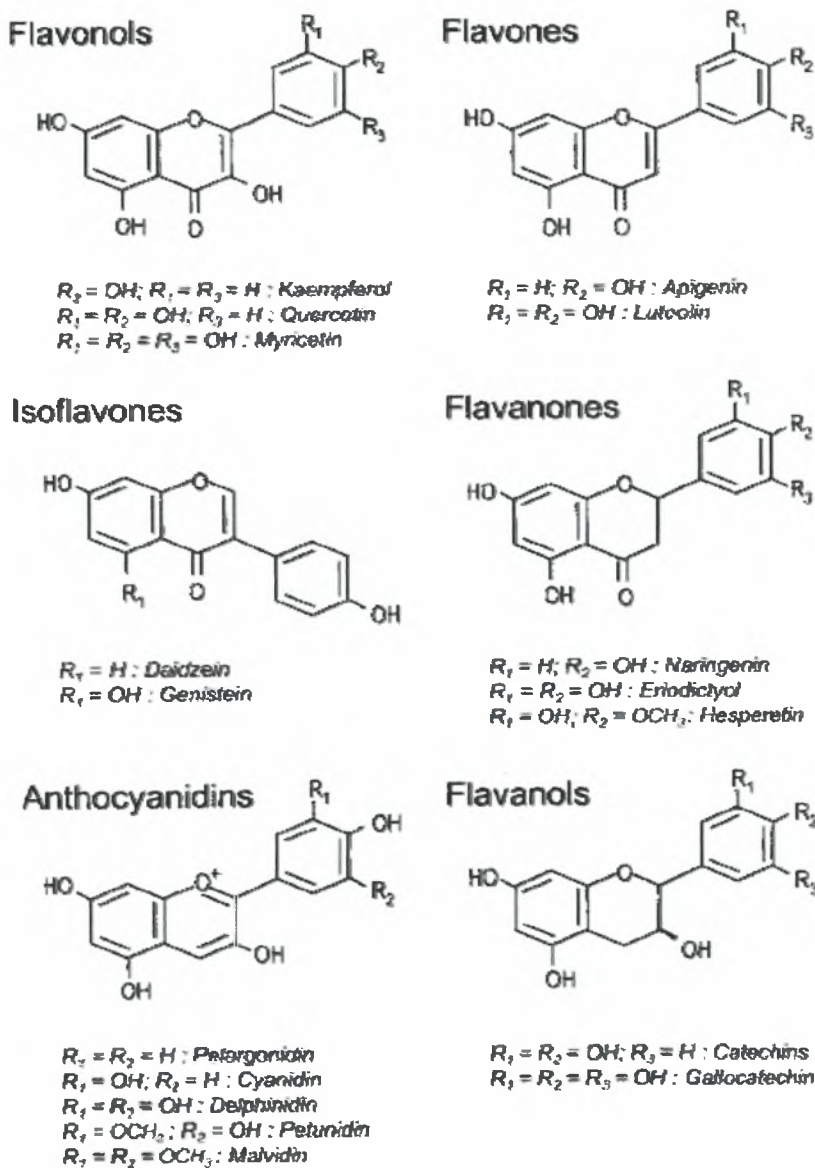


$R_1 = \text{OH}$  : Coumaric acid  
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$  : Caffeic acid  
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$  : Ferulic acid

Εικόνα 3: Χημική δομή υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμικών οξέων

1.2.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν φαινολικές ενώσεις οι οποίες είναι ευρέως διαδεδομένες σε όλα τα αγγειώδη φυτά και είναι υπεύθυνα για το χρώμα των λουλουδιών ενώ είναι σημαντικά για την φυσιολογική ανάπτυξη, επέκταση και άμυνα του φυτού. Τα φλαβονοειδή έχουν όλα ένα κοινό ανθρακικό σκελετό από διφαινυλικά προπάνια και δύο βενζοϊκούς δακτυλίους ενωμένους με μια γραμμική τριπλή ανθρακική αλυσίδα. Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανονόλες, φλαβανόλες, ισοφλαβόνες, ανθοκυανιδίνες και προανθοκυανιδίνες ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση του κεντρικού πυρανικού δακτυλίου (Εικόνα 4) (G. Di Carlo et al., 1999).



Εικόνα 4: Χημική δομή φλαβονοειδών



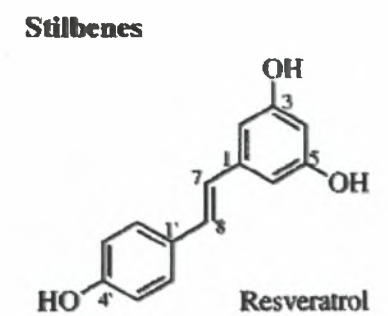
Οι φλαβονόλες είναι από τα πιο άφθονα φλαβονοειδή που υπάρχουν στις τροφές με περισσότερο συνηθισμένες τις κερκετίνη, καιμπερόλη και μυρικετίνη. Οι φλαβανόνες βρίσκονται συνήθως στα εσπεριδοειδή φρούτα και οι φλαβόνες στο σέλινο, ενώ οι κατεχίνες που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβανόνων, φλαβανόλων βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο πράσινο και το μαύρο τσάι και στο κόκκινο κρασί. Οι ανθοκυανίνες βρίσκονται στις φράουλες και σε άλλα σαρκώδη φρούτα. Τέλος οι ισοφλαβόνες όπως οι γενιστεΐνη και ντενζεΐνη βρίσκονται στα όσπρια και κυρίως στη σόγια (G. Di Carlo et al., 1999).

Εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές λειτουργίες όπως την πρωτεϊνοσύνθεση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την αγγειογένεση. Ακόμη εμφανίζουν δράση αναστολέα ενζύμων πρόδρομων τοξικών ουσιών και αναγωγικού μέσου καθώς και άμυνα ενάντια στην έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Επίσης εμπλέκονται στην φωτοδερματίτιδα, στην μεταφορά ενέργειας, στη μορφογένεση, στον καθορισμό του φύλου, στα επίπεδα της αναπνοής και της φωτοσύνθεσης, στο μηχανισμό ανάπτυξης των φυτικών ορμονών και των ρυθμιστών και στην γονιδιακή έκφραση. Τέλος παίζουν σημαντικό ρόλο στην αγγειακή προστασία, εμφανίζουν αντιηπατοτοξική, αντιαλλεργική, αντιοστεοπορωτική, αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση. Έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την εντερική κινητική και έκκριση, μειώνουν την πιθανότητα καρδιαγγειακών παθήσεων, τους διαβητικούς καταρράκτες και την αθηροσκλήρωση και τέλος παρουσιάζουν αντιιικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες (G. Di Carlo et al., 1999, L. Le Marchand, 2002).

Από τα πιο σημαντικά φλαβονοειδή ακόμη, είναι τα ισοφλαβονοειδή. Χωρίζονται σε 5 κατηγορίες στις ισοφλαβόνες (isoflavones), ισοφλαβάνες (isoflavanes), ισοφλαβανόνες (isoflavanones), κουμεστάνες (coumestanes), πτεροκαρπάνες (pterocarpanes). Εμφανίζουν αρκετά οφέλη για την υγεία αφού παρουσιάζουν προστατευτική δράση ενάντια σε καρδιαγγειακές παθήσεις όπως η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία και η καρδιακή θρόμβωση καθώς και ενάντια στην οστεοπόρωση και στο κλιμακτηριακό σύνδρομο (S. Watanabe et al., 2002). Οι ισοφλαβόνες ανήκουν στα φυτοοιστρογόνα και εμφανίζουν οιστρογονική, αντιοιστρογονική, αντικαρκινική, αντιϊκή, αντιμυκητιακή και αντιοξειδωτική δράση (W. Mazur et al., 1998). Οι μηχανισμοί δράσης των ισοφλαβόνων περιλαμβάνουν την δράση τους σαν οιστρογόνα, αναστολείς τυροσινικών κινασών και αντιοξειδωτικών αλλά εμπλέκουν και την ρύθμιση της έκφρασης του TGF και τις επιπτώσεις στα συστήματα ιονικής μεταφοράς (S. Barnes et al., 2000).

### 1.2.3 Στιλβένια

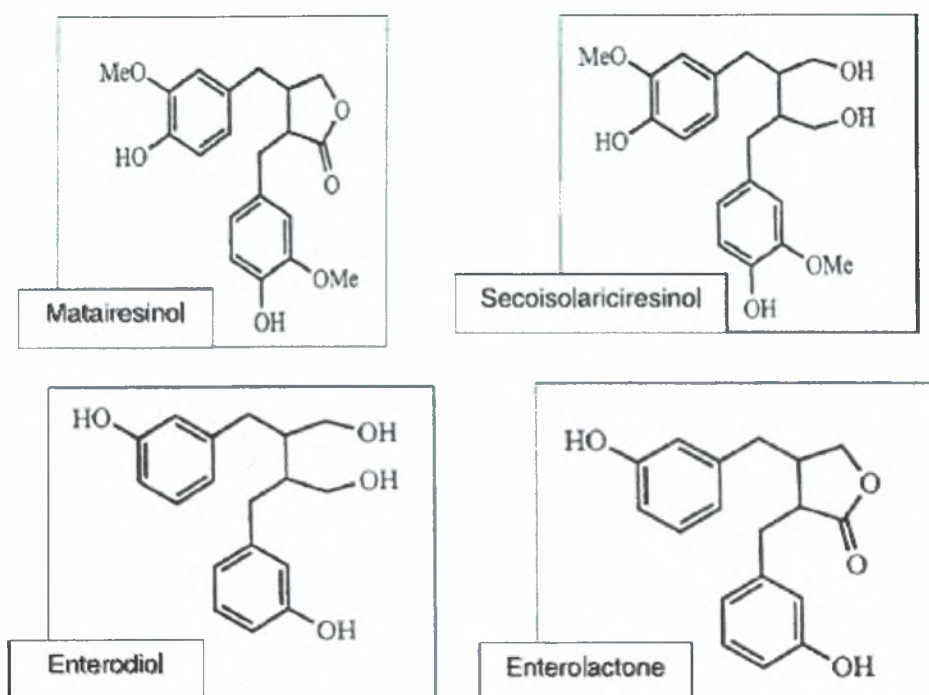
Τα στιλβένια αποτελούνται από δύο φαινυλικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου (C.S.Yang et al., 2001). Η ρεσβερατρόλη (resveratrol) είναι το κυριότερο μέλος της ομάδας των στιλβενίων και βρίσκεται συχνότερα στα σαρκώδη φρούτα είτε σε ελεύθερη μορφή είτε με τη μορφή του γλυκοσιδίου (Εικόνα 5). Η ρεσβερατρόλη έχει παρατηρηθεί ότι έχει σημαντικές βιολογικές ιδιότητες όπως αναστολή του σχηματισμού ελεύθερων ριζών και αναστολή της κυκλοξυγενάσης 1. Εμφανίζει επίσης αντιοξειδωτικές και αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες, ενώ αναστέλλει την βιοενεργοποίηση των καρκινογόνων και επάγει τα μεταβολικά ένζυμα της φάσης II. Τέλος εμφανίζει οιστρογονική δράση και μπορεί να λειτουργήσει σαν ανοσοκατασταλτικός και ανοσοπροαγωγικός παράγοντας (S. Nishenametla and T. Taruscio, 2006).



Εικόνα 5: Χημική δομή της ρεσβερατρόλης

### 1.2.4 Λιγνάνες

Οι λιγνάνες ανήκουν στην ομάδα των φυτοοιστρογόνων μαζί με τα φλαβονοειδή και τις κουμεστάνες. Εμφανίζουν ένα διφαινυλικό δακτύλιο που καθιστά τη δομή τους όμοια με τα ενδογενή οιστρογόνα. Απομονώνονται από τα ξυλώδη μέρη των φυτών, τα επικαλύμματα των σπόρων και τους αλεσμένους κόκκους. Φυτικές λιγνάνες είναι η ματαιρεσινόλη (matairesinol) και η σεκοϊσολαρισρεσινόλη (secoisolariciresinol) ενώ τα ζωικά τους παράγωγα είναι η εντεροδιόλη (enterodiols) και η εντερολακτόνη (enterolactone) (Εικόνα 6). Βρίσκονται κυρίως στους φυτικούς κόκκους, στα φρούτα και τα λαχανικά. Μία από τις πιο γνώστες δράσεις τους είναι η αναστολή της προκαλούμενης από ορμόνη καρκινογένεσης αφού δρουν σαν οιστρογόνα ενώ εμφανίζουν και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (A. Webb and M. McCullough, 2005).



Εικόνα 6: Χημική δομή φυτικών λιγνάνων και των ζωικών παραγώγων τους

### 1.3 Χημειοπροστασία και καρκίνος

#### 1.3.1 Καρκίνος

Καρκίνος ορίζεται ως η ασθένεια κατά την οποία συμβαίνουν διαταραχές στην φυσιολογική διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης οι οποίες ελέγχονται από γενετικά συστατικά του κυττάρου. Αιτίες του καρκίνου θεωρούνται διάφορα καρκινογόνα όπως οι ιοί, διάφορα χημικά και η ακτινοβολία καθώς και οι χρωμοσωμικές ανακατατάξεις, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και οι αυθόρμητες μεταλλάξεις. Κάποια χημικά τα προκαρκινογόνα δεν είναι άμεσα καρκινογόνα αλλά πρέπει να μεταβολιστούν για να δώσουν τα τελικά καρκινογόνα (L. Reddy et al., 2003). Ο μεταβολισμός γενικά διαφόρων ουσιών, ο οποίος είτε πρόκειται να οδηγήσει στην ενεργοποίηση προκαρκινογόνων είτε στην απενεργοποίησή τους γίνεται μέσω των αντιδράσεων της φάσης I και II. Οι αντιδράσεις της φάσεως I αλλάζουν ή απομακρύνουν ενεργές ομάδες από το αρχικό μόριο της ουσίας μέσω οξείδωσης, αναγωγής και υδρόλυσης. Ένα από τα κυριότερα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές είναι το κυτόχρωμα P450. Οι αντιδράσεις της φάσης II προσθέτουν άλλες ομάδες στο μόριο μέσω σύζευξης με γλυκουρονικό, γλουταθειόνη, θειικό, αμινοξέα και οξικό (Y. Shukla et al., 2004).

Η καρκινογένεση δηλαδή ο μετασχηματισμός ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό είναι μία διαδικασία που εμπεριέχει πολλά στάδια. Τα στάδια τα οποία θεωρούνται ότι ακολουθεί η καρκινογένεση είναι η μύηση-έναρξη (initiation), η προαγωγή (promotion) και η

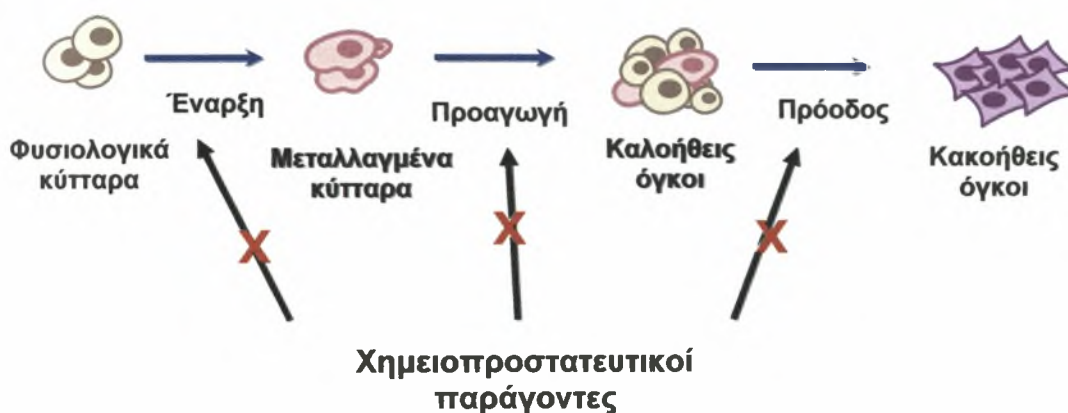
πρόοδος (progression) (Εικόνα 7). Τα τρία αυτά στάδια είναι χρονικά καθορισμένα σε φυσιολογικές συνθήκες. Αρχικά, για την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας απαραίτητη προϋπόθεση είναι η πραγματοποίηση μεταλλάξεων στο DNA, οι οποίες μπορούν να προκληθούν από διάφορους παράγοντες. Στο στάδιο της έναρξης συμβαίνει αντίδραση μεταξύ του καρκινογόνου και του DNA του κυττάρου, που οδηγεί στην δημιουργία μεταλλάξεων. Το στάδιο αυτό είναι μη αντιστρεπτό ενώ μόνο κάτω από κάποιες προϋποθέσεις μπορεί το κύτταρο σε επόμενο στάδιο να εξελιχθεί σε καρκινικό. Στην συνέχεια ακολουθεί το στάδιο της προαγωγής. Το στάδιο εξελίσσεται πολύ αργά και σε αυτό συνεχόμενες μεταλλάξεις μπορεί να συμβαίνουν μέρα με τη μέρα, που προκύπτουν από την έκθεση σε περιβαλλοντικά καρκινογόνα. Τα ενδογενή μεταβολικά μιτογόνα συμβάλλουν στην δυσλειτουργία ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, των ρυθμιστικών πρωτεϊνών απόπτωσης και των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Στο στάδιο αυτό μπορεί να συμβεί κλωνική επέκταση των μεταλλαγμένων κυττάρων που έχουν χάσει κάποιες από τις φυσιολογικές λειτουργίες τους ενώ είναι αντιστρεπτό αφού απαιτεί ένα προαγωγέα που όταν αποσυρθεί τότε σταματά η ανάπτυξη του καρκίνου. Στο στάδιο της προόδου που ακολουθεί λαμβάνει χώρα η διάδοση του καρκίνου. Τα κύτταρα αποκτούν τον καρκινικό φαινότυπο και έχουν χάσει τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού τους, την ικανότητα διαφοροποίησης τους, την ικανότητα να επικοινωνούν με γειτονικά κύτταρα ενώ έχουν την ικανότητα να διηθούνται και να μεθίστανται. Το στάδιο αυτό δεν είναι αντιστρεπτό αφού πρόκειται για μόνιμο μετασχηματισμό των κυττάρων (I. Shureiqi et al., 1999, L. Reddy et al., 2003).

### 1.3.2 Χημειοπροστασία

Τα στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας αλλά και η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτά δείχνουν ότι μπορεί να προληφθεί. Η παρεμπόδιση του καρκίνου μπορεί να επιτευχθεί μέσω τριών προσεγγίσεων: 1) Μείωση της ανθρώπινης έκθεσης σε περιβαλλοντικά καρκινογόνα μέσω ελέγχου του χώρου εργασίας και ενθάρρυνσης της αλλαγής του τρόπου ζωής, 2) Ταυτοποίηση των συστατικών υψηλού ρίσκου για την ανάπτυξη καρκίνου μέσω προδιάθεσης γενετικών ή βιοχημικών παραγόντων, 3) Εξασφάλιση της χημειοπροστασίας με διαιτητικά ή συνθετικά μέσα (G.D. Stoner et al., 1997). Χημειοπροστασία ορίζεται ως η παρεμπόδιση, αναστολή ή αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας μέσω ενός ή περισσότερων ουσιών χρησιμοποιούμενα είτε σαν φάρμακα είτε σαν φυσικά συστατικά της διατροφής (Y. Shukla et al., 2004). Σήμερα θεωρείται μία σημαντική προσέγγιση για την πρόληψη του καρκίνου (J. Smith et al., 2005).



Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες χωρίζονται ανάλογα με το στάδιο της καρκινογένεσης στο οποίο επιδρούν (Εικόνα 7). Χωρίζονται στους παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου (blocking agents) οι οποίοι δρουν στο πρώιμο στάδιο της μύησης-έναρξης και στους καταστολείς της νεοπλασματικής ανάπτυξης (suppressing agents) οι οποίοι δρουν στα στάδια της προαγωγής και της προόδου της καρκινογένεσης. Μια ακόμη κατηγορία χημειοπροστατευτικών παραγόντων αποτελούν οι αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου (inhibitors of carcinogen formation) οι οποίοι έχουν προστατευτική δράση πριν την διαδικασία της καρκινογένεσης (Y.Shukla et al., 2004).



Εικόνα 7: Σημεία δράσης χημειοπροστατευτικών παραγόντων

#### Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες

- 1) Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τους παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου (blocking agents) στους οποίους ανήκουν οι αναστολείς του κυτοχρώματος P450, οι επαγωγείς του κυτοχρώματος P450, οι επαγωγείς των ενζύμων της φάσης 2, οι εξουδετερωτές των ηλεκτρόφιλων και των ελεύθερων ριζών και οι επαγωγείς των ενζύμων αποκατάστασης βλαβών του DNA (G.D.Stoner et al., 1997).
- 2) Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τους καταστολείς της νεοπλασματικής ανάπτυξης (suppressing agents) στους οποίους ανήκουν οι αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμίνων, οι επαγωγείς της τελικής διαφοροποίησης, οι ρυθμιστές της οδού μετάδοσης του μηνύματος, οι ρυθμιστές της δράσης των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων, οι αναστολείς της δράσης των ογκογονιδίων, οι επαγωγείς της κυτταρικής επικοινωνίας, οι παράγοντες αποκατάστασης της ανοσολογικής απάντησης, οι επαγωγείς της απόπτωσής, οι επιδιορθωτές της ανισσοροπίας της μεθυλίωσης του DNA, οι αναστολείς της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης και οι αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος (G.D.Stoner et al., 1997). Ακόμη σε αυτή την

κατηγορία χημειοπροστατευτικών παραγόντων ανήκουν και οι αναστολείς των **τοποϊσομερασών**, τα οποία είναι ένζυμα σημαντικά για την κυτταρική διαίρεση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αφού απαιτούνται για την ολοκλήρωση της μίτωσης (E. Gonzalez de Mejia et al., 2006).

- 3) Η τρίτη κατηγορία περιλαμβάνει τους αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου (inhibitors of carcinogen formation) περιλαμβάνοντας τους παρεμποδιστές σχηματισμού των νιτροζαμίνων από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη σε όξινο περιβάλλον. Παραδείγματα τέτοιων αναστολέων είναι το ασκορβικό οξύ, το φερουλικό, το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ, τα σουλφιδριλικά παράγωγα, η προλίνη και η θειοπρολίνη (G.D.Stoner et al., 1997).

#### **1.4 Πολυφαινόλες και χημειοπροστασία**

Τα περισσότερα από τα φυτά που καταναλώνονται από τους ανθρώπους είναι πλούσια σε πολυφαινόλες. Έχει παρατηρηθεί ότι οι διατροφικές πολυφαινόλες επιδεικνύουν σημαντικές χημειοπροστατευτικές δράσεις λόγω των αντιοξειδωτικών και ποικίλων αντικαρκινικών τους ιδιοτήτων (C.S.Yang et al., 2001).

##### **1.4.1 Αντικαρκινική δράση**

Ποικίλες αντικαρκινικές ιδιότητες έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες, οι οποίες αποκαλύπτουν μηχανισμούς με τους οποίους μπορούν να θεωρηθούν ότι δρουν ως σημαντικοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες. Αρχικά, οι πολυφαινόλες έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να δρουν σαν παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου στο πρώιμο στάδιο της μύησης και να επηρεάζουν τον μεταβολισμό των προκαρκινογόνων μέσω προσαρμογής της έκφρασης των ενζύμων του κυτοχρώματος P450, το οποίο εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των καρκινογόνων. Επίσης έχει βρεθεί ότι, διευκολύνουν την απέκκριση των καρκινογόνων αυξάνοντας την έκφραση των ενζύμων της φάσης II και μειώνουν τον σχηματισμό των μνημένων κυττάρων διεγείροντας τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA (A. Scalbert et al., 2005, C.S. Yang et al., 2001).

Κατά δεύτερον, έχει παρατηρηθεί ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να δρουν σαν κατασταλτικοί παράγοντες και αναστέλλουν τον σχηματισμό και την ανάπτυξη των όγκων από αρχικώς μνημένα κύτταρα αφού αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό *in vitro* και επηρεάζουν τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που σχετίζονται με την ανάπτυξη μέσω αναστολής της πρωτεϊνικής κινάσης C και της AP-1 εξαρτώμενης μεταγραφικής δραστηριότητας (A. Scalbert et al., 2005, C.S. Yang et al., 2001).

Επίσης έχει βρεθεί ότι έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την έκφραση των ογκογονιδίων, την δραστηριότητα της δικαυβοξυλάσης της ορνιθίνης, ενός ενζύμου κλειδί στην σύνθεση των πολυαμίνων που σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος. Συγκεκριμένα οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την δραστηριότητα της κυκλοοξυγενάσης-2 και τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος στην βλεννώδη μεμβράνη των ποντικών. Τα φαινολικά φυτοοιστρογόνα επηρεάζουν την ανάπτυξη των όγκων που προκαλούνται από ορμόνες αφού μπορούν να επηρεάσουν την απόκριση των ενδογενών οιστρογόνων. Οι πολυφαινόλες επίσης επηρεάζουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και μειώνουν την ανάπτυξη των όγκων (I.T. Johnson, 2007).

Επίσης κάποιες πολυφαινόλες έχει παρατηρηθεί ότι ενισχύουν τις αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις των αντικαρκινικών φαρμάκων. Ωστόσο, η δράση των πολυφαινόλων εξαρτάται και από τη δόση στα ζώα ή στα κύτταρα στα διάφορα πειράματα. Περισσότερες πληροφορίες για την επίδραση των πολυφαινόλων στην παρεμπόδιση του καρκίνου μπορούν να προκύψουν από κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες, οι ίκοι βιοδείκτες είναι χρήσιμα εργαλεία για την πρόγνωση, τον έλεγχο της θεραπείας και τον υπολογισμό της επίδρασης της διατροφής στην ασθένεια. Τα συμπληρώματα πολυφαινόλων είναι χρήσιμα σαν βοηθήματα στην χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπευτική μέθοδο (A. Scalbert et al., 2005, C.S. Yang et al., 2001).

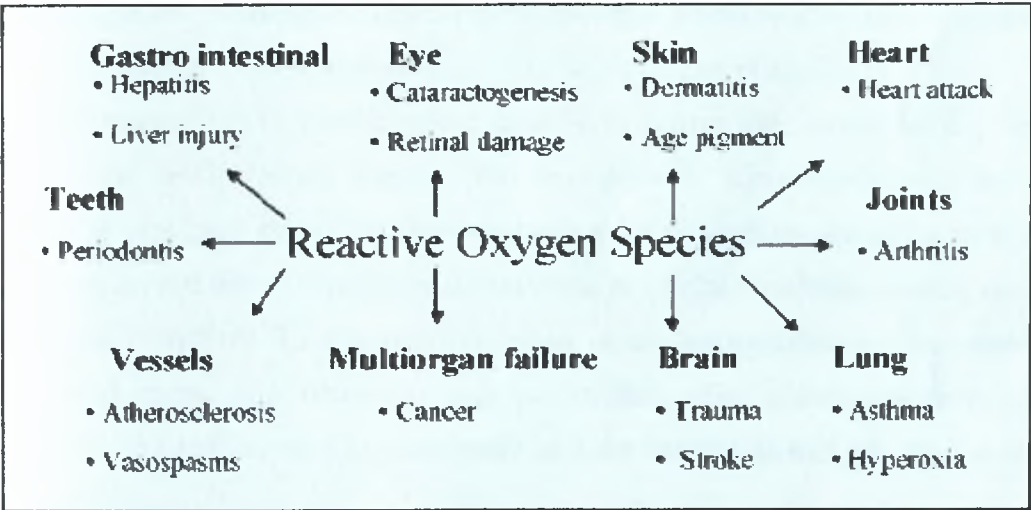
Ακόμη έχει αναφερθεί ότι αρκετά φλαβονοειδή προερχόμενα από φυτά αναστέλλουν διάφορα ρυθμιστικά ένζυμα όπως την πρωτεϊνική κινάση C, την αντίστροφη μεταγραφάση και τις DNA τοποϊσομεράσες. Συγκεκριμένα για τις DNA τοποϊσομεράσες, οι οποίες εμπλέκονται σε πολλές και σημαντικές διεργασίες τόσο του DNA όσο και του ίδιου του κυττάρου οι αναστολείς εμφανίζουν τη δράση τους με δύο τρόπους, είτε πριν το σχηματισμό συμπλόκου του ενζύμου με το DNA είτε μετά (A. Constantinou et al., 1995).

## **1.4.2 Αντιοξειδωτική δράση**

### **1.4.2.1 Ελεύθερες ρίζες**

Με τον όρο ελεύθερες ρίζες ορίζουμε τα μόρια τα οποία περιλαμβάνουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στο ατομικό ή μοριακό τροχιακό (B. Halliwell, 2001). Αυτά τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια συνήθως δίνουν ένα αξιοσημείωτο βαθμό δραστηριότητας στις ελεύθερες ρίζες. Οι ρίζες που προέρχονται από το οξυγόνο αντιπροσωπεύουν την σημαντικότερη τάξη ελεύθερων ριζών που παράγονται στους ζωντανούς οργανισμούς (M. Valko et al., 2004).

Με τον όρο ROS (Reactive Oxygen Species) περιλαμβάνονται σχεδόν όλες τις ελεύθερες ρίζες. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) χωρίζονται στις οξυγονοκεντρικές ρίζες στις οποίες ανήκουν η ρίζα του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) (superoxide radical), του υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ ) (hydroxyl radical), και οι ρίζες περοξυλίου ( $ROO^{\cdot}$ ) (peroxyl radicals) και στις λεγόμενες μη ρίζες οι οποίες έχουν ως κεντρικό άτομο το οξυγόνο και στις οποίες ανήκουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και η μονήρης κατάσταση του οξυγόνου ( $^1O_2$ ). Άλλες ελεύθερες ρίζες είναι κάποιες δραστικές μορφές αζώτου όπως το μονοξείδιο του αζώτου ( $NO^{\cdot}$ ) και το διοξείδιο του αζώτου ( $NO_2^{\cdot}$ ). Οι διάφορες ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν σε αρκετά χημικά και βιολογικά συστήματα όπως και κατά τη διάρκεια σχηματισμού των πλαστικών, παλαίωσης των χρωμάτων, καύσης των καυσίμων καθώς και μέσα στο ανθρώπινο σώμα (B. Halliwell, 2001). Ακόμη οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν κατά την αναπνευστική αλυσίδα, από προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα, κατά την λιπιδική οξείδωση, από ακτινοβολία, από φλεγμονή, από κάπνισμα και από μολυσμένη ατμόσφαιρα. Στην Εικόνα 8 παρατίθενται μερικές κλινικές καταστάσεις στις οποίες εμπλέκονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (J.Lee et al., 2003).



**Εικόνα 8:** Κλινικές καταστάσεις με τις οποίες έχει βρεθεί ότι σχετίζονται οι ROS

1.4.2.2 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Ως αντιοξειδωτικό θεωρείται οποιαδήποτε ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός οξειδωμένου υποστρώματος επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος (B. Halliwell, 2001). Τα αντιοξειδωτικά ασκούν τη δράση τους είτε εμποδίζοντας την οξείδωση των ευαίσθητων βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες είτε περιορίζοντας τον σχηματισμό των ελεύθερων ριζών (A. Scalbert et al., 2005). Συγκεκριμένα, τα αντιοξειδωτικά προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το



ηλεκτρόνιο ή το υδρογόνο που τους λείπει και έτσι εμποδίζουν τη δράση τους ή ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά συστήματα (B. Halliwell, 2001).

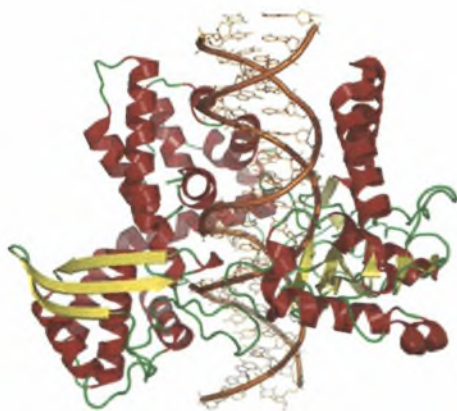
Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται στους ενζυμικούς και μη. Στους ενζυμικούς ανήκουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα τα οποία μετατρέπουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου σε μη δραστικά μόρια ενώ στους μη ενζυμικούς ανήκουν κάποιες πρωτεΐνες, βιταμίνες, λιπίδια, μέταλλα και ουσίες όπως οι πολυφαινόλες.

Έχει βρεθεί ότι οι διάφορες πολυφαινόλες εμφανίζουν την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω των φαινολικών τους ομάδων οι οποίες λειτουργούν σαν δέκτες ηλεκτρονίων για να σχηματίσουν σταθερές φαινοξυλικές ρίζες οι οποίες σταματούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης (A.Scalbert et al., 2005). Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δράσης των πολυφαινόλων περιλαμβάνουν και την ικανότητα τους να δρουν σαν δότες υδρογόνου και να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα. Η κυριότερη κατηγορία πολυφαινόλων με αντιοξειδωτική δράση είναι τα φλαβονοειδή τα οποία είναι αποτελεσματικοί εξουδετερωτές ριζών υδροξυλίου και περοξυλίου, σχηματίζουν συμπλέγματα με μέταλλα και εμποδίζουν την προκαλούμενη από μέταλλα λιπιδική οξείδωση. Συγκεκριμένα τα ισοφλαβονοειδή όπως η γενιστεΐνη δρώντας συνεργιστικά με το ασκορβικό οξύ εμποδίζουν την καταλυόμενη από λιποοξυγενάση λιπολιπιδική οξείδωση σταθεροποιώντας τις LDL δομές (J. Lee et al., 2003).

Οι τοκοφερόλες και οι τοκοτριενόλες ασκούν τη δράση τους μεταφέροντας ένα άτομο υδρογόνου στην 6-υδροξυλική ομάδα του δακτυλίου ή εξουδετερώνοντας τη μονήρη κατάσταση του οξυγόνου και άλλες ελεύθερες ρίζες. Το ασκορβικό οξύ ασκεί τη δράση του είτε μεταφέροντας ένα άτομο υδρογόνου σε λιπιδικές ρίζες είτε εξουδετερώνοντας την μονήρη κατάσταση του οξυγόνου. Τα καροτενοειδή είναι οι πιο αποτελεσματικοί καταστολείς της μονήρους κατάστασης του οξυγόνου ενώ τα λιποϊκά οξέα εξουδετερώνουν τις ρίζες, δεσμεύουν χηλικά μέταλλα και αλληλεπιδρούν με άλλα αντιοξειδωτικά. (Y.Fang et al., 2002, J.Lee et al., 2003).

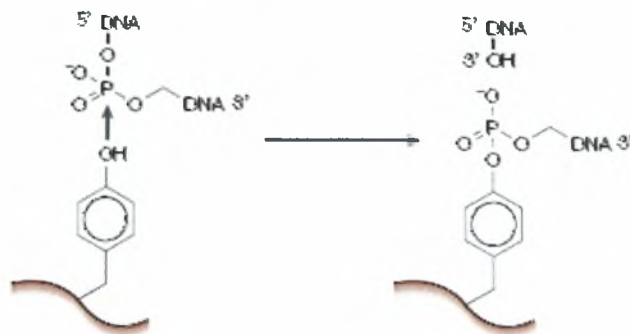
### 1.5 Τοποϊσομεράσες

Οι τοποϊσομεράσες είναι ένζυμα τα οποία αλλάζουν τον αριθμό συνδέσεων του DNA καταλύοντας το πέρασμα DNA αλυσίδων μέσα από άλλες προκαλώντας μονόκλωνα ή δίκλωνα σπασίματα. Αποτελούν πολύ σημαντικά ένζυμα παρουσιάζοντας ένα πλήθος βιολογικών λειτουργιών. Συγκεκριμένα αφαιρούν υπερελικώσεις του DNA οι οποίες δημιουργούνται κατά τη διάρκεια πολλών κυτταρικών διεργασιών όπως κατά την αντιγραφή και την μεταγραφή, διαχωρίζουν τις διπλές αλυσίδες του DNA, εμπλέκονται στην σταθερότητα του γενόματος, ρυθμίζουν τα κυτταρικά τους επίπεδα και αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες ενώ η ευκαρυωτική DNA τοποϊσομεράση II εμπλέκεται στην συμπύκνωση και αποσυμπύκνωση της δομής της χρωματίνης. Το πρώτο γνωστό μέλος της τάξης των τοποϊσομεράσων το οποίο συγκεκριμένα χαλαρώνει αρνητικά υπερελικωμένο DNA απομονώθηκε από αποστάγματα κυττάρων *E. Coli* το 1971. Αυτό το εύρημα ακολουθήθηκε από την ανακάλυψη μιας δραστηρότητας στα εκχυλίσματα κυττάρων ποντικού η οποία χαλαρώνει αρνητικά και θετικά υπερελικωμένο DNA και μιας ATP-εξαρτώμενης *E. Coli* δραστηριότητας ικανής να εισάγει αρνητικές υπερελικώσεις σε χαλαρωμένο DNA. Από αυτές τις δραστηρότητες προέκυψαν τα ένζυμα τοποϊσομεράσες. Χωρίζονται σε δύο διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με την πρωτοταγή μορφή τους, την τοποϊσομεράση I (Εικόνα 9) η οποία ανήκει στα ένζυμα τύπου I και προκαλεί τοπολογικές αλλαγές στο DNA μέσω παροδικής αποκοπής μιας DNA αλυσίδας κάθε φορά ώστε να επιτρέψει το πέρασμα μίας άλλης αλυσίδας, και την τοποϊσομεράση II η οποία ανήκει στα ένζυμα τύπου II και καταλύει DNA τοπολογικούς μετασχηματισμούς μέσω παροδικής αποκοπής ενός ζευγαριού συμπληρωματικών DNA αλυσίδων σε ένα διπλό τμήμα για να δημιουργήσει μία πύλη στο τμήμα για το πέρασμα μιας άλλης αλυσίδας (Εικόνα 10) (J.C. Wang, 1996).



**Εικόνα 9:** Το ένζυμο της τοποϊσομεράσης I γύρω από το DNA.

Τα ένζυμα αυτά είναι απαραίτητα για την αντιγραφή, την μεταγραφή και τον ανασυνδυασμό και διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην διαμόρφωση της χρωμοσωμικής δομής, στην συμπύκνωση και αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και στον διαχωρισμό των αδερφών χρωματίδων (S.J. Froelich-Ammon et al., 1995).



**Εικόνα 10:** Κατάλυση παροδικού σπασίματος στο DNA από τοποϊσομεράσες

Οι τοποϊσομεράσες έχει αποδειχτεί ότι είναι αποτελεσματικοί χημειοθεραπευτικοί στόχοι αφού εμφανίζονται σε μεγάλες ποσότητες στα καρκινικά κύτταρα. Έχουν βρεθεί δύο γενικές κατηγορίες αναστολέων τους, τα λεγόμενα poisons τα οποία σταθεροποιούν τα παροδικά σπασίματα προκαλώντας συνεχόμενα προκαλούμενα από το ένζυμο σπασίματα στο DNA και οι καταστολείς οι οποίοι δρουν εμποδίζοντας συνολικά την καταλυτική δραστηριότητα των ενζύμων (B. Montaner et al., 2005, C. Baily, 2000).

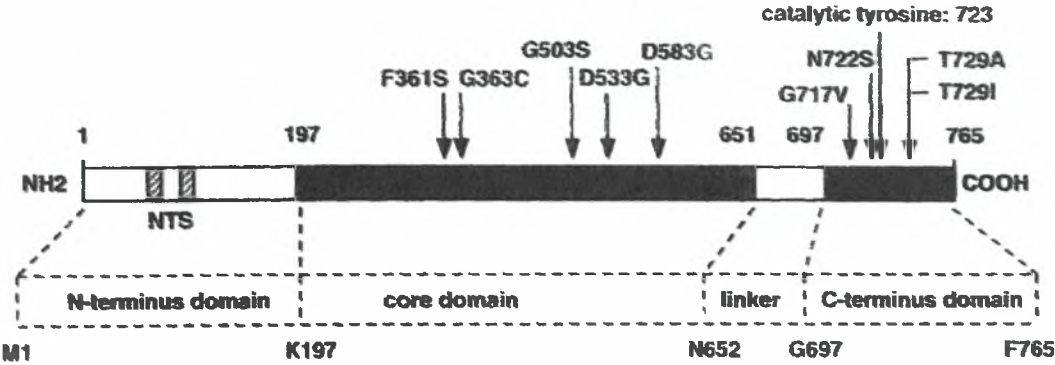
### 1.5.1 DNA τοποϊσομεράση I

Η DNA τοποϊσομεράση I (Εικόνα 9) δρα σχηματίζοντας παροδικά μονόκλωνα σπασίματα μέσα από τα οποία περνούν άλλες DNA αλυσίδες. Εξαιτίας αυτής της ιδιότητας του ενζύμου να χαλαρώνει το DNA παρεμβαίνει σε πολλές διεργασίες όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή και η συμπύκνωση της χρωματίνης διαλύοντας το στρες που δημιουργείται από τη στρέψη του DNA κατά τη δημιουργία του σπασίματος. Η DNA τοποϊσομεράση I χωρίζεται σε δύο τύπους την τοποϊσομεράση IA και την τοποϊσομεράση IB (J.B. Leppard et al., 2005).

#### 1.5.1.1 Δομή του ενζύμου

Η δομή της τοποϊσομεράσης I είναι οργανωμένη σε τέσσερις περιοχές. Η N-τελική περιοχή (N-terminus domain) η οποία είναι πολύ επιρρεπής στην πρωτεόλυση, διαθέσιμη για δραστηριότητα και συνδέεται σε άλλες πρωτεΐνες. Η πυρηνική περιοχή (core domain) η οποία σχηματίζει ένα τμήμα 54kDa το οποίο είναι ανθεκτικό στην πρωτεόλυση και προτιμά να

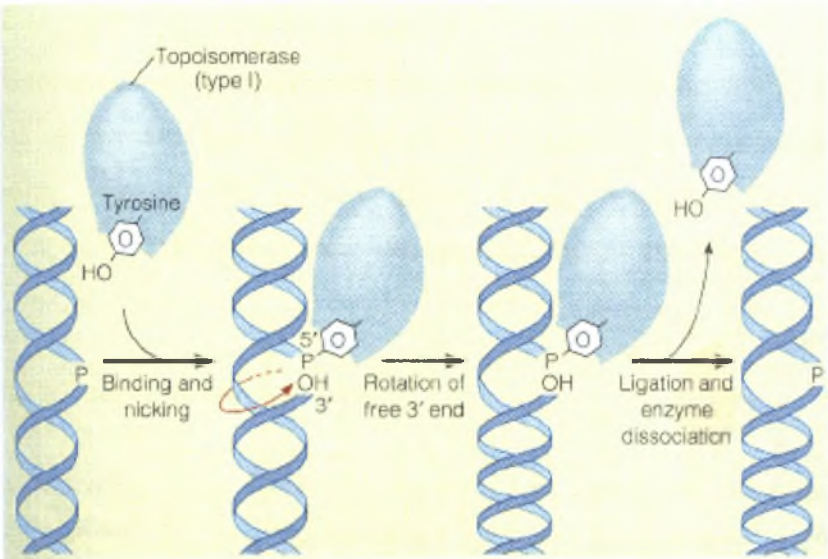
συνδέεται σε υπερελικωμένο DNA. Η συνδετική περιοχή (linker domain) η οποία είναι μικρή, δεν είναι φυλογενετικά διατηρημένη, είναι γενικά θετικά φορτισμένη και η παράλειψη της δεν επηρεάζει την δράση του ενζύμου. Η C-τελική περιοχή (C-terminus domain) η οποία περιέχει την καταλυτική τυροσίνη στη θέση 723, τα κατάλοιπα από το Gly713 έως το Gly717 εμπλέκονται στην κατάλυση αλλά όχι στην σύνδεση με την πυρηνική περιοχή ενώ τα τελευταία 5 κατάλοιπα της περιοχής είναι σημαντικά για το διμερισμό με την πυρηνική περιοχή (Εικόνα 11) (Y. Pommier, 1998).



Εικόνα 11: Οργάνωση των περιοχών της τοποϊσομεράσης I

1.5.1.2 Μηχανισμός δράσης τοποϊσομεράσης I

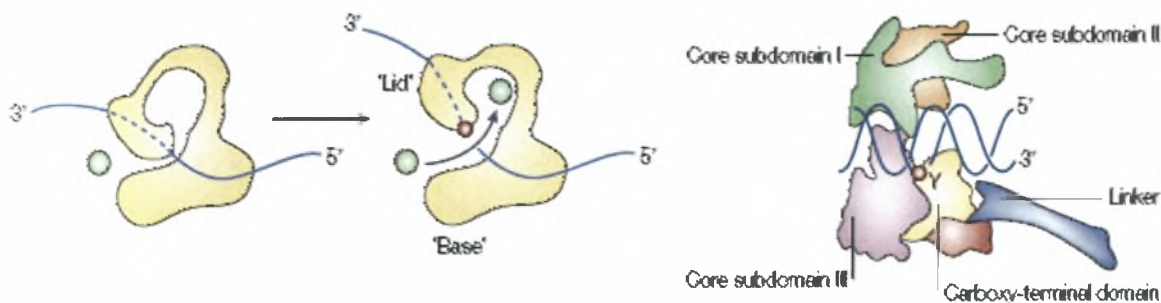
Η τοποϊσομεράση I προκαλεί ένα μονόκλωνο σπάσιμο στο DNA και ακινητοποιεί το 5' άκρο με ένα ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ μιας φωσφορικής ομάδας του DNA και ενός καταλοίπου τυροσίνης. Η περιστροφή του 3' άκρου ακολουθείται από απελευθέρωση του ενζύμου από την αλυσίδα DNA. Ακολουθεί επανασύνδεση της DNA αλυσίδας που διασπάστηκε (Mathews and Van Holde, Biochemistry, second edition 1995) (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης I



Η τοποϊσομεράση ΙΑ εμφανίζει διαφορετικό πρότυπο δράσης από την τοποϊσομεράση ΙΒ στο πέρασμα της μονής αλυσίδας DNA ή της διπλής έλικας από το παροδικό σπάσιμο που προκαλεί. Κατά το παροδικό σπάσιμο της DNA αλυσίδας από την τοποϊσομεράση ΙΑ το 5' άκρο της σπασμένης DNA αλυσίδας είναι ομοιοπολικά προσαρτημένο στην ενεργή περιοχή της τυροσίνης και το 3' άκρο είναι μη ομοιοπολικά συνδεδεμένο στη βάση (base) του ενζύμου. Απομακρύνοντας την καμπί (lid) ανοίγει η πύλη στο DNA για το πέρασμα της άλλης αλυσίδας. Η δεύτερη αλυσίδα πρέπει να περάσει από την κεντρική κοιλότητα του ενζύμου πριν την επανασύνδεση της σπασμένης αλυσίδας. Στην περίπτωση της τοποϊσομεράσης ΙΒ το 3' άκρο της σπασμένης DNA αλυσίδας είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στην ενεργή περιοχή τυροσίνης του ενζύμου. Το προκαλούμενο από το ένζυμο σπάσιμο χωρίζει το DNA σε δύο τμήματα, το δεξιό τμήμα δεν είναι ισχυρά συνδεδεμένο στο ένζυμο και έτσι επιτρέπει την περιστροφή του DNA τμήματος. Η περιστροφή αυτή επιτρέπει πολλαπλά περάσματα αλυσίδων για κάθε κύκλο σπασίματος και επανένωσης (Εικόνα 13) (J.C. Wang, 2002).



**Εικόνα 13:** Αριστερά: Πρότυπο δράσης της τοποϊσομεράσης ΙΑ. Δεξιά: Πρότυπο δράσης της τοποϊσομεράσης ΙΒ

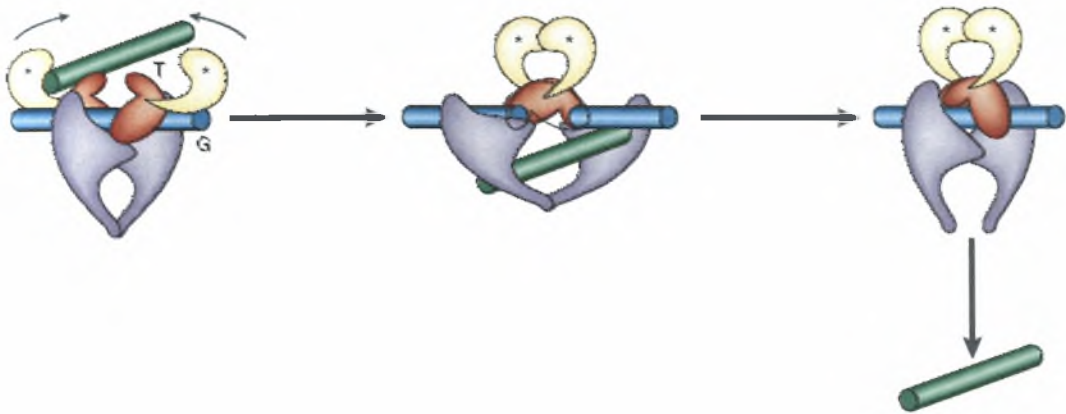
### 1.5.2 DNA Τοποϊσομεράση II

Η DNA τοποϊσομεράση II υπάρχει σε δύο ισομορφές την α και την β, λειτουργεί μετά την αντιγραφή κατά τον διαχωρισμό των αδερφών χρωματίδων ή ανακατασκευάζοντας την χρωματινική δομή. Ανήκει στα ένζυμα τύπου II και προκαλεί δίκλωνα σπασίματα λειτουργώντας σαν ομό ή ετεροδιμερές και απαιτεί ATP για την κατάλυση (Cancer Medicine, 6th Edition).

#### 1.5.2.1 Μηχανισμός δράσης τοποϊσομεράσης II

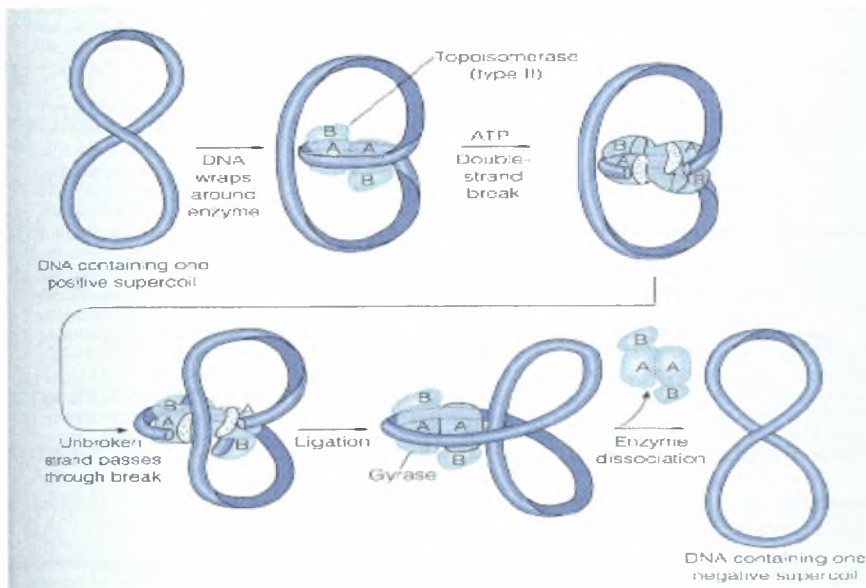
Στην τοποϊσομεράση II, η κατάλυση περιλαμβάνει πρόσδεση ενός διπλού τμήματος DNA από το διμερές ένζυμο που ακολουθείται από σχηματισμό ενός ATP-εξαρτώμενου συμπλόκου περιέλιξης γύρω από ένα άλλο διπλό τμήμα DNA το οποίο θα περάσει μέσα από

το πρώτο τμήμα DNA. Το σπάσιμο του πρώτου διπλού τμήματος συμβαίνει κατά ή μετά το σχηματισμό του συμπλόκου περιέλιξης. Το πέρασμα του δεύτερου διπλού τμήματος μέσα από τη σχισμή που δημιουργείται από το σπάσιμο του πρώτου αλλάζει την τοπολογία του DNA. Ο μηχανισμός του συμπλόκου περιέλιξης μειώνει το ρίσκο της ακατάλληλης απελευθέρωσης από το παροδικό διπλό σπάσιμο που δημιουργήθηκε από το ένζυμο (Εικόνα 14) (J.C. Wang, 2002).



Εικόνα 14: Πρότυπο της κατάλυσης από την τοποϊσομεράση II

Συγκεκριμένα ο μηχανισμός δράσης περιλαμβάνει την κατάλυση του δίκλωνου σπασίματος από το ένζυμο και στην συνέχεια την ακινητοποίηση των άκρων μέχρι μια άλλη διπλή έλικα να περάσει μέσα από το σπάσιμο που δημιουργήθηκε. Στην διαδικασία αυτή απαιτείται ενέργεια (ATP). Ακολουθεί η επανασύνδεση του δίκλωνου DNA στο οποίο αρχικά προκλήθηκε το σπάσιμο και απομάκρυνση του ενζύμου (Εικόνα 15) (Mathews and Van Holde, Biochemistry, second edition 1995).



Εικόνα 15: Αναλυτικός μηχανισμός δράσης της τοποϊσομεράσης II

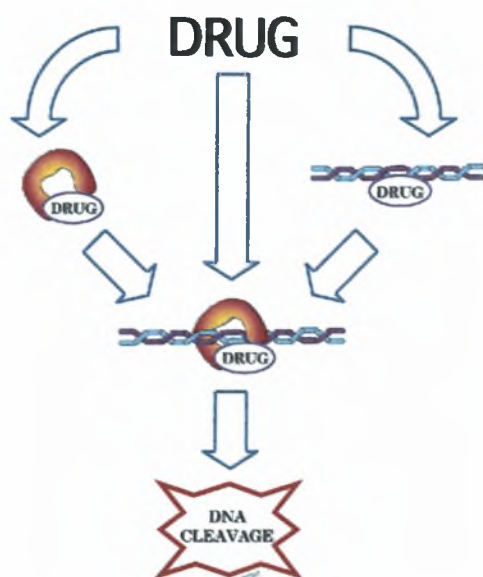
### **1.5.3 Τοποϊσομεράσες και καρκίνος**

Όπως προαναφέρθηκε οι τοποϊσομεράσες είναι ένζυμα σημαντικά για πολλές κυτταρικές διεργασίες και γι' αυτό κρίνεται απαραίτητη η σωστή λειτουργία τους. Η τοποϊσομεράσες συνδέονται με το DNA με στόχο την πρόκληση σπασιμάτων. Σε φυσιολογικές συνθήκες η συγκέντρωση του συμπλόκου της τοποϊσομεράσης με το DNA στο κύτταρο είναι χαμηλή όμως σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να αυξηθεί. Αυτές οι συνθήκες, αυξάνουν την πιθανότητα μεταλλάξεων, παρεμβολών, ελλείψεων και χρωμοσωμικών ανωμαλιών που μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές βλάβες στο γένωμα ενός οργανισμού με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία καρκίνου. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι οι τοποϊσομεράσες βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα στα καρκινικά κύτταρα γιατί πολλαπλασιάζονται πολύ γρήγορα και αφού αποτελούν καίρια ένζυμα για την αντιγραφή και την γενωμική σταθερότητα αποτελούν στόχο πολλών αντικαρκινικών φαρμάκων. Έτσι παράγοντες οι οποίοι επιδρούν στην δράση τόσο της τοποϊσομεράσης I και όσο και της II θεωρούνται σημαντικοί αντικαρκινικοί παράγοντες (S.J. Froelich-Ammon et al., 1995).

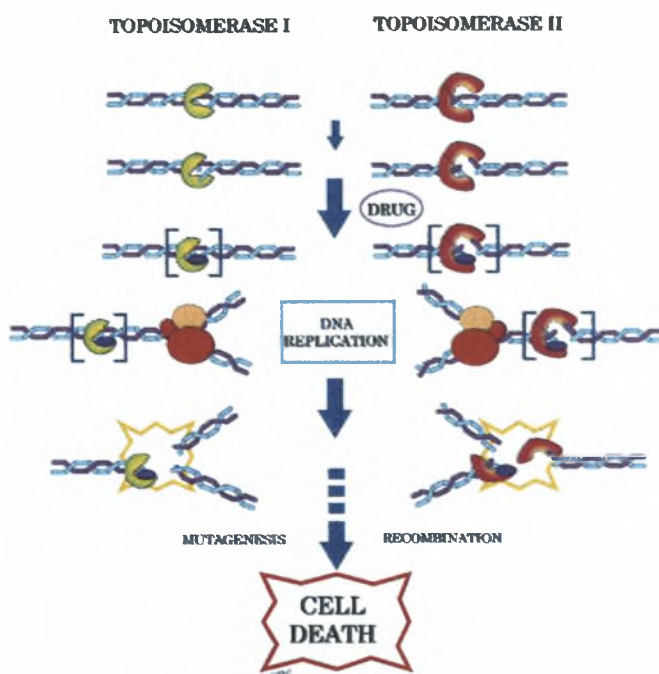
### **1.5.4 Αναστολείς των τοποϊσομερασών**

Οι αναστολείς των τοποϊσομερασών χωρίζονται στους καταστολείς και τα λεγόμενα poisons. Οι καταστολείς καταστέλλουν τη δράση του ενζύμου εμποδίζοντας κυρίως τη σύνδεση του στο DNA ενώ τα poisons (Εικόνα 17) επιτρέπουν στο ένζυμο να συνδεθεί ομοιοπολικά στο DNA και να προκαλέσει σπάσιμο, αλλά εμποδίζουν την ακόλουθη επανασύνδεση του αρχικού σπασίματος σταθεροποιώντας το ομοιοπολικό σύμπλοκο της τοποϊσομεράσης με το DNA που προκαλεί συνεχόμενα σπασίματα. Η σταθεροποίηση του συμπλόκου που προκαλεί τα σπασίματα δεν είναι απαραίτητα κυτταροτοξική καθώς χρειάζονται και κάποια άλλα γεγονότα για να δημιουργηθούν τοξικές βλάβες στο DNA. Τα λεγόμενα poisons των τοποϊσομερασών λόγω αυτής τους της ικανότητας να σταθεροποιούν το σύμπλοκο που προκαλεί τα σπασίματα έχουν ταυτοποιηθεί σαν σημαντικά αντινεοπλασματικά φάρμακα αφού επηρεάζουν τα ένζυμα τα οποία βρίσκονται σε υψηλότερα επίπεδα στα καρκινικά κύτταρα από ότι στα φυσιολογικά (M. Lopez-Lazaro et al., 2002).

Ο σχηματισμός του συμπλόκου τοποϊσομεράση-DNA-φάρμακο, όπου φάρμακο είναι ο αναστολέας της τοποϊσομεράσης μπορεί να συμβεί μέσω 3 τρόπων, είτε το φάρμακο συνδέεται πρώτα στην τοποϊσομεράση και μετά δημιουργείται το σύμπλοκο με το DNA είτε συνδέεται στο DNA και μετά δημιουργείται το σύμπλοκο με την τοποϊσομεράση είτε δημιουργείται πρώτα το σύμπλοκο τοποϊσομεράση-DNA και μετά σ' αυτό συνδέεται το φάρμακο (Εικόνα 16) (S.J. Froelich-Ammon et al., 1995).



**Εικόνα 16:** Τρόποι με τους οποίους δημιουργείται το σύμπλοκο τοποϊσομεράση-DNA-φάρμακο



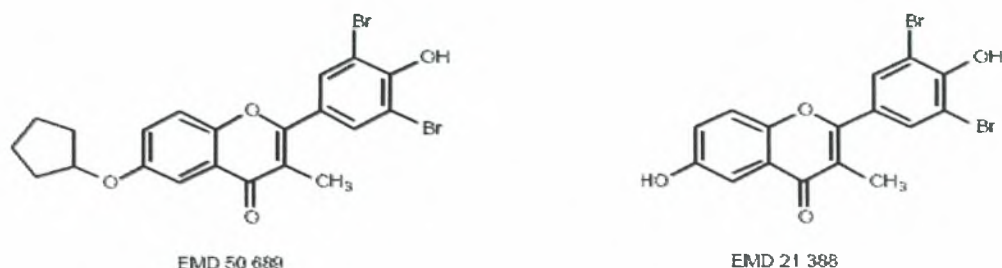
**Εικόνα 17:** Μηχανισμός κυτταροτοξικότητας από τα λεγόμενα poisons των τοποϊσομερασών I και II

Χαρακτηριστικοί αναστολείς των τοποϊσομερασών τόσο της τοποϊσομεράσης I όσο και της II είναι οι εξής:

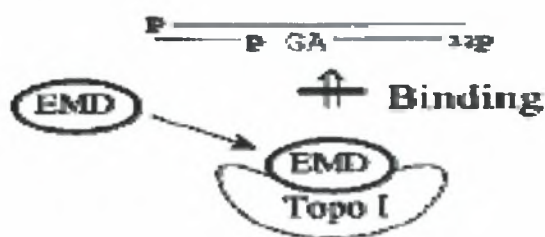
1. Καταστολέας της τοποϊσομεράσης I είναι το EMD (6-cyclopentanyloxy-3', 5'-dibromo-4'-hydroxy-3-methylflavone) (Εικόνα 18) το οποίο είναι συνθετικό



παράγωγο της δομής των φλαβόνων και το οποίο δρα μέσω σύνδεσης στην ελεύθερη τοποϊσομεράση I εμποδίζοντας τη σύνδεση του ενζύμου στο τμήμα DNA που πρόκειται να κοπεί εμποδίζοντας έτσι όλα τα υπόλοιπα βήματα του καταλυτικού κύκλου (Εικόνα 19) (F. Boege et al., 1996).

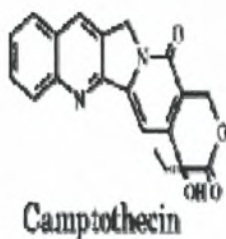


Εικόνα 18: Χημική δομή δύο μορφών του EMD

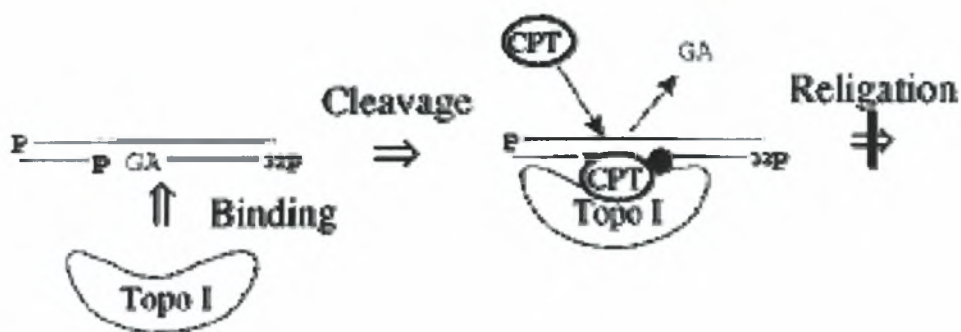


Εικόνα 19: Μηχανισμός δράσης του EMD

2. Poison της τοποϊσομεράσης I είναι η καμπτοθεκίνη (camptothecin) (Εικόνα 20) η οποία απομονώθηκε πριν 20 χρόνια σαν ενεργό αλκαλοειδές από αποστάγματα από το κινέζικο φυτό *Camptotheca acuminata* (Y.Pommier, 1993). Η καμπτοθεκίνη συνδέεται στο ομοιοπολικό σύμπλοκο τοποϊσομεράσης I - DNA που προκαλεί τα σπασίματα και εμποδίζει την επανασύνδεση του DNA (Εικόνα 21) (F. Boege et al., 1996).

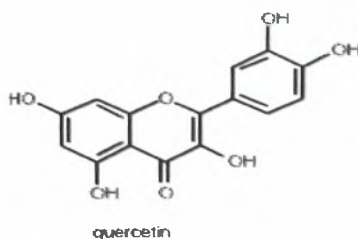


Εικόνα 20: Χημική δομή της καμπτοθεκίνης

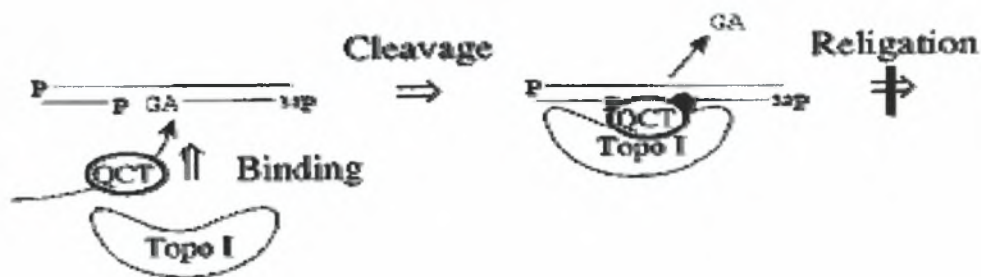


Εικόνα 21: Μηχανισμός δράσης καμπτοθεκίνης

3. Poison της τοποϊσομεράσης I είναι και κάποια φλαβονοειδή όπως η κερκετίνη (quercetin) (Εικόνα 22) η οποία συνδέεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σπασίματος στο ομοιοπολικό σύμπλοκο τοποϊσομεράσης I - DNA και εμποδίζει την επανασύνδεση των σπασμένων κομματιών αλλά δεν εμπλέκεται στην σύνδεση του ενζύμου στο DNA ή στην αντίδραση σπασίματος (Εικόνα 23) (F. Boege et al., 1996).



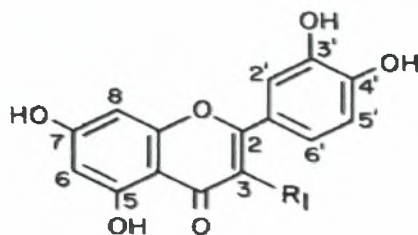
Εικόνα 22: Χημική δομή της κερκετίνης



Εικόνα 23: Μηχανισμός δράσης κερκετίνης στην τοποϊσομεράση I

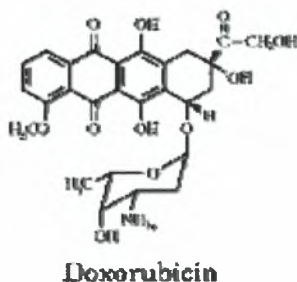
4. Καταστολείς της τοποϊσομεράσης I είναι επίσης και κάποια φλαβονοειδή όπως η λουτεΐνη (Εικόνα 24) η οποία εμποδίζει την καταλυτική δραστηριότητα της ευκαρυωτικής DNA τοποϊσομεράσης I. Έχει δειχτεί ότι προεπάση του ενζύμου με λουτεΐνη πριν την προσθήκη του DNA υποστρώματος αυξάνει την αναστολή της

καταλυτικής δραστηριότητας ενώ μεταχείριση του DNA με λουτεΐνη πριν την προσθήκη του ενζύμου μειώνει αυτή την ανασταλτική δράση (A.R. Chowdhury et al., 2002).



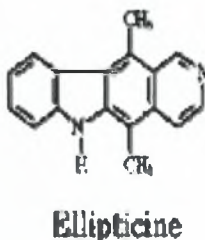
**Εικόνα 24:** Χημική δομή της λουτεΐνης όπου  $R_1=H$

5. Αναστολείς της τοποϊσομεράσης II είναι οι ανθρακυκλίνες όπως η δοξορουβικίνη (doxorubicin) (Εικόνα 25) η οποία συνδέεται με την πυρηνική χρωματίνη σχηματίζοντας ένα τριαδικό σύμπλεγμα με την τοποϊσομεράση II και το DNA που προκαλεί διάσπαση του κλώνου (H.Wang et al., 1997).



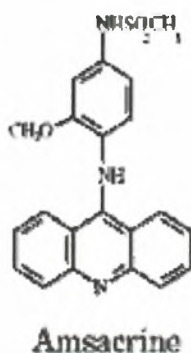
**Εικόνα 25:** Χημική δομή της δοξορουβικίνης (doxorubicin)

6. Αναστολείς της τοποϊσομεράσης II είναι τα ανάλογα της ελλιπτικίνης (ellipticine) (Εικόνα 26) τα οποία προκαλούν είτε την αποσύνδεση της τοποϊσομεράσης είτε τον σχηματισμό του συμπλόκου τοποϊσομεράση II - DNA που προκαλεί συνεχόμενα σπασίματα (H.Wang et al., 1997).



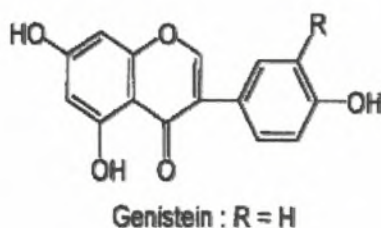
**Εικόνα 26:** Χημική δομή της ελλιπτικίνης (ellipticine)

7. Αναστολείς της τοποϊσομεράσης II είναι οι μακαλουβαμίνες όπως η αμσακρίνη (amsacrine) (Εικόνα 27) η οποία δημιουργεί διαμεσολαβούμενα από το ένζυμο δίκλιωνα σπασίματα (H.Wang et al., 1997).



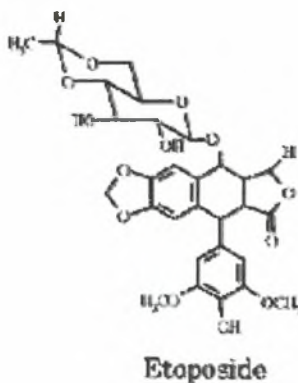
**Εικόνα 27:** Χημική δομή της αμσακρίνης (amsacrine)

8. Αναστολείς της τοποϊσομεράσης II είναι και κάποια φλαβονοειδή όπως η γενιστεΐνη (genistein) (Εικόνα 28) η οποία σταθεροποιεί το σύμπλοκο της τοποϊσομεράσης II με το DNA (H.Wang et al., 1997).



**Εικόνα 28:** Χημική δομή της γενιστεΐνης (genistein)

9. Αναστολείς της τοποϊσομεράσης II είναι οι επιποδοφυλλοτοξίνες όπως η ετοποσίδη (etoposide) (Εικόνα 29) η οποία όπως και η γενιστεΐνη σταθεροποιεί το σύμπλοκο της τοποϊσομεράσης II με το DNA (H.Wang et al., 1997).



**Εικόνα 29:** Χημική δομή της ετοποσίδης (etoposide)

### **1.5.5 Πολυφαινόλες ως αναστολείς τοποϊσομερασών**

Σύμφωνα με τα παραπάνω προκύπτει ότι φαινολικές ουσίες όπως η γενιστεΐνη, η λουτεΐνη, η κερκετίνη καθώς και άλλες θεωρούνται σημαντικοί αναστολείς της δράσης των τοποϊσομερασών και έτσι σημαντικοί αντικαρκινικοί παράγοντες (M. Webb- S. Ebeler, 2004).

### **1.6 Σκοπός**

Στα πλαίσια γενικής μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων φυτικών εκχυλισμάτων ελληνικών φυτών, με έμφαση στις χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν διάφορα φυτικά εκχυλίσματα που προέρχονται από μοναδικά ελληνικά φυτά ψυχανθών της οικογένειας *Leguminosae*. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παρατήρηση της δράσης αυτών των εκχυλισμάτων και κλασμάτων τους πλούσιων σε πολυφαινολικές ενώσεις στη δράση της τοποϊσομεράσης I. Η τοποϊσομεράση I, αποτελεί σημαντικό ένζυμο το οποίο συμμετέχει σε ζωτικές λειτουργίες του κυττάρου. Έχει παρατηρηθεί ότι οι τοποϊσομεράσες βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα στα καρκινικά κύτταρα γιατί πολλαπλασιάζονται πολύ γρήγορα και αφού αποτελούν καίρια ένζυμα για την αντιγραφή και την γενωμική σταθερότητα αποτελούν στόχο πολλών αντικαρκινικών φαρμάκων. Έτσι παράγοντες οι οποίοι επιδρούν στην δράση τόσο της τοποϊσομεράσης I και II θεωρούνται σημαντικοί αντικαρκινικοί, χημειοπροστατευτικοί παράγοντες. Συνολικά μελετήθηκαν 11 υδατικά εκχυλίσματα φυτών, 2 μεθανολικά εκχυλίσματα από τα φυτά *Vicia faba* και *Lotus edulis*, 10 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba* και 4 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis*.



## Φυτά της οικογένειας *Leguminosae*

### 1. *Phaseolus vulgaris*

Το γένος *Phaseolus* ανήκει στην οικογένεια των ψυχανθών *Fabaceae* η οποία αποτελείται από περίπου 50 είδη φυτών τα οποία όλα προέρχονται από την Αμερική. Πιο χαρακτηριστικό από όλα είναι το κοινό φασόλι (*Phaseolus vulgaris*) (Εικόνες 30, 31) το οποίο είναι ένα φυλλώδης ετήσιο φυτό που σήμερα καλλιεργείται παγκοσμίως σε τροπικά, ημιτροπικά και ήπια κλίματα ενώ πολλά είδη *Phaseolus* καταναλώνονται και ως τρόφιμα. Συγκεκριμένα το φύλλωμα του χρησιμοποιείται σαν λαχανικό ενώ είναι ένα από τα είδη που παράγονται σε μεγάλες ποσότητες στην Ελλάδα ([www.Wikipedia.com](http://www.Wikipedia.com)).



Εικόνα 30: *Phaseolus vulgaris* (Σπόροι)



Εικόνα 31: *Phaseolus vulgaris* (Φυτό + καρποί)

### 2. *Lathyrus laxiflorus*- *Lathyrus clymenum*

Το γένος *Lathyrus* περιλαμβάνει κυρίως τα ανθοφόρα φυτά της οικογένειας ψυχανθών *Fabaceae*. Υπάρχουν 160 είδη τα οποία εντοπίζονται σε ήπια κλίματα και συγκεκριμένα 52 είδη στην Ευρώπη, 30 είδη στην Βόρεια Αμερική, 78 είδη στην Ασία, 24 είδη στην Ανατολική Αφρική και 24 είδη στην Νότια Αμερική ενώ χωρίζονται σε ετήσια και ολοετή που μπορεί να είναι αναρριχώμενα ή θαμνώδη. Το *Lathyrus laxiflorus* (Εικόνα 32) είναι μη εδώδιμο ψυχανθές ενώ το *Lathyrus clymenum* (Εικόνα 33) είναι εδώδιμο ψυχανθές. Και τα δύο είδη εντοπίζονται σε διάφορα μέρη της Ελλάδας ([www.Wikipedia.com](http://www.Wikipedia.com)).



Εικόνα 32: *Lathyrus laxiflorus*



Εικόνα 33: *Lathyrus clymenum*

### 3. *Lens culinaris*

Το γένος *Lens* ανήκει στην οικογένεια *Fabaceae*. Το φυτό *Lens culinaris* (Εικόνα 34) δίνει ως καρπούς τις ευρέως καταναλούμενες φακές. Ανήκει στα ετήσια φυτά, καλλιεργείται σε θερμό κλίμα και τροπικές ζώνες ενώ έχει παρατηρηθεί ότι παρουσιάζει συμβιωτική σχέση με συγκεκριμένα βακτήρια του εδάφους τα οποία σχηματίζουν εξογκώματα στις ρίζες των φυτών και ατμοσφαιρικό άζωτο παρέχοντας έτσι και μια σημαντική πηγή αζώτου ([www.pfaf.org](http://www.pfaf.org)).



**Εικόνα 34:** *Lens culinaris*

### 4. *Lupinus albus*

Το φυτό *Lupinus albus* είναι μέλος του γένους *Lupinus* της οικογένειας *Fabaceae* (Εικόνα 35). Πρόκειται για ένα παραδοσιακό όσπριο που καλλιεργείται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου, ανήκει στα ετήσια φυτά ενώ καταναλώνεται ως τρόφιμο. Παρουσιάζει αρκετές ιδιότητες όπως διάρκεια στο χρόνο καλλιέργειας και στο ρυθμό ανάπτυξης, φωτοπεριοδική ευαισθησία, ανθεκτικό σχήμα, ανοχή στην ξηρασία και σκληραγωγία στο κρύο ([www.Wikipedia.com](http://www.Wikipedia.com)).



**Εικόνα 35:** *Lupinus albus*

### 5. *Vicia faba*

Το φυτό *Vicia faba* (Εικόνες 36, 37) είναι ένα είδος ψυχανθούς της οικογένειας *Fabaceae* προερχόμενο από τη Βόρεια Αφρική και την Νοτιοδυτική Ασία το οποίο καλλιεργείται σε μεγάλο βαθμό και σε άλλες περιοχές. Τα φύλλα του φυτού είναι πτεροειδή με 2-7 φυλλάρια και έχουν ένα ευδιάκριτο γκριζοπράσινο χρώμα, τα λουλούδια αποτελούνται από 5 πέταλα ενώ ο καρπός (legume) είναι ένα πλατύ σκληρό περικάρπιο οσπρίου με μια πλατιά χνουδωτή επιφάνεια που μέσα περιέχει 3-8 σπόρους. Πρόκειται για ένα διπλοειδές φυτό όπου κάθε κύτταρο περιέχει 12 χρωμοσώματα (6 ομόλογα ζεύγη). Οι καρποί είναι γνωστοί ως κουκιά, καταναλώνονται ως τρόφιμα και είναι σημαντικό κομμάτι της Μεσογειακής διατροφής ενώ επιδεικνύουν και μια σειρά από σημαντικά οφέλη για την υγεία αφού είναι πλούσια σε πολλά ζωτικά συστατικά για τον οργανισμό του ανθρώπου ([www.Wikipedia.com](http://www.Wikipedia.com)).



**Εικόνα 36:** *Vicia faba* (Φυτό)



**Εικόνα 37:** *Vicia faba* (Σπόροι)

#### 6. *Lotus edulis*

Το γένος *Lotus* ανήκει στην οικογένεια φυτών *Fabaceae* και προέρχεται από την Ευρώπη και συγκεκριμένα από την περιοχή της Μεσογείου. Το φυτό *Lotus edulis* (Εικόνα 38) είναι ετήσιο, παρουσιάζει συμβιωτικές σχέσεις με βακτήρια του εδάφους τα οποία σχηματίζουν εξογκώματα στις ρίζες των φυτών και παράγουν ατμοσφαιρικό άζωτο γι' αυτό και αποτελεί σημαντική πηγή αζώτου ενώ καταναλώνεται και ως τρόφιμο ([www.pfaf.org](http://www.pfaf.org)).



**Εικόνα 38:** *Lotus edulis*



2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Εκχυλίσματα και κλάσματα καθαρών μορίων

Στην παρούσα μελέτη δοκιμάστηκε η δράση 11 υδατικών εκχυλισμάτων φυτών της οικογένειας *Leguminosae* και ένα υδατικό εκχύλισμα σταφυλιού της ποικιλίας υδατικό Μανδηλαριάς (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Υδατικά εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας *Leguminosae*

Φυτά της οικογένειας <i>Leguminosae</i>	Τμήμα φυτού <sup>a</sup>
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Σπέρματα, Πόα
<i>Lathyrus laxiflorus</i> subsp. <i>Laxiflorus</i>	Πόα
<i>Vicia faba</i>	Πόα
<i>Lens culinaris</i>	Πόα, Σπέρματα
<i>Lathyrus clymenum</i>	Σπέρματα
<i>Lotus edulis</i>	Πόα, Σπέρματα
<i>Lupinus albus</i>	Σπέρματα, Πόα
Υδ. Εκχύλισμα Μανδηλαριάς	Καρπός

<sup>a</sup> Τμήμα φυτού από το οποίο προέκυψε το εκχύλισμα

Ακόμη δοκιμάστηκαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα πόας των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis* καθώς και κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από αυτά τα εκχυλίσματα (Πίνακας 2). Τα κλάσματα που απομονώθηκαν από το φυτό *Vicia faba* αποτελούν μείγματα φαινολικών ενώσεων, κυρίως γλυκοσυλιωμένες μορφές φλαβονοειδών ενώ αυτά από το φυτό *Lotus edulis* αποτελούν μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις, συγκεκριμένα γλυκοσυλιωμένες μορφές καιμπερόλης.

Πίνακας 2: Εκχυλίσματα και κλάσματα καθαρών μορίων από τα φυτά *Vicia faba* και *Lotus edulis*

<i>Vicia faba</i>	<i>Lotus edulis</i>
Vfm 6-9	Le C2
Vfm 13-15	Le C6
Vfm 25-28	Le D3
Vfm 32-34	Le D6
Vfm 76-81	Μεθ. Εκχύλισμα πόας
Vfm 92-97	
Vfm 115	
Vfm 135-137	
Vfm 155-160	
Vfm 171-176	
Μεθ. Εκχύλισμα πόας	

**2.1.2 Πλασμιδιακό DNA**

Πλασμίδιο Bluescript-SK+ ενσωματωμένο σε βακτήρια E. Coli

**2.1.3 Απομόνωση πλασμιδίου**

LB Broth (Scharlau-Ισπανία)

NaCl (Panreac-Ισπανία)

Αμπικιλίνη (Ampicilin) (Sigma-Γερμανία)

Sol 1(solution 1): Γλυκόζη (glucose) (Panreac-Ισπανία), Tris (Merck-Γερμανία) (pH=8), EDTA (Panreac-Ισπανία)

Sol 2(solution 2): SDS 10% (Sigma-Γερμανία), NaOH (Merck-Γερμανία)

Sol 3(solution 3): potassium acetate (Sigma-Γερμανία), οξικό οξύ (Merck-Γερμανία)

Προπανάλη (Merck-Γερμανία)

Αιθανόλη (Merck-Γερμανία)

RNase (Sigma-Γερμανία)

**2.1.4 Topoisomerase I relaxation assay**

Ένζυμο: τοποϊσομεραση I(pGEM) από σπόρο σιταριού Promega

DTT (DiThioThreitol-Διθειοθρεϊτόλη) (Applichem-Γερμανία)

Γλυκερόλη (Glyserol) (Panreac-Ισπανία)

Tris (Merck-Γερμανία)

HCl (Merck-Γερμανία)

NaCl (Panreac-Ισπανία)

EDTA (Panreac-Ισπανία)

Βορικό οξύ (Boric acid) (Sigma-Γερμανία)

Αγαρόζη (agarose) (Seakem-H.Π.Α)

Χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue) (Research Organics- H.Π.Α)

Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethithium Bromide) (Merck-Γερμανία)

2.2 Μέθοδοι

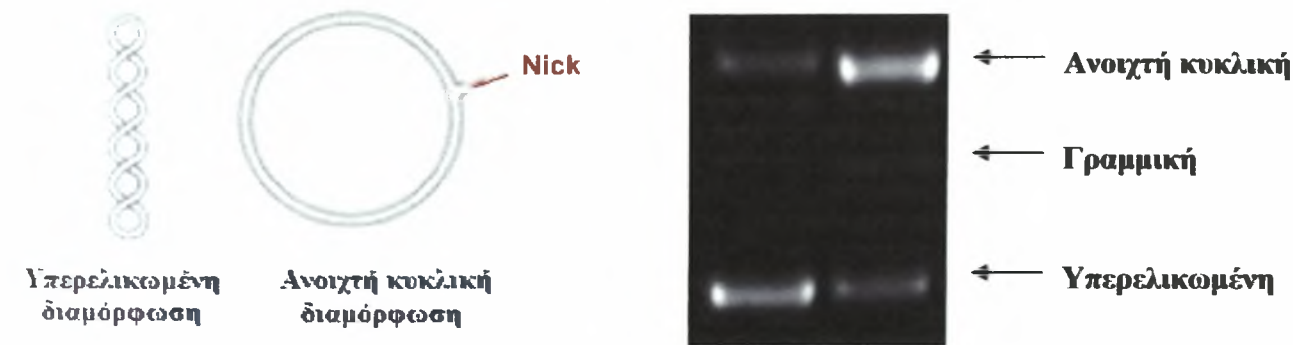
Topoisomerase I relaxation assay

2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα του ενζύμου τοποϊσομεράση I να προκαλεί μονόκλωνα σπασίματα σε πλασμιδιακό DNA. Το πλασμιδιακό DNA έχει την ιδιότητα όταν τρέχει μέσω ηλεκτροφόρησης σε gel αгарόζης να εμφανίζεται σε τρεις διαμορφώσεις:

- 1. Την υπερελικωμένη στην οποία το πλασμίδιο βρίσκεται στην πιο συμπτυκνωμένη μορφή.
- 2. Την ανοιχτή κυκλική στην οποία μεταβαίνει το πλασμίδιο μετά από μονόκλωνα σπασίματα.
- 3. Την γραμμική στην οποία μεταβαίνει το πλασμίδιο μετά από δίκλωνα σπασίματα. Οι διαμορφώσεις αυτές τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε gel ηλεκτροφόρησης και όσο πιο μικρή σε μέγεθος είναι η διαμόρφωση τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αгарόζης. Έτσι πρώτο τρέχει το υπερελικωμένο μετά το γραμμικό και τέλος το ανοιχτό κυκλικό.

Όταν η τοποϊσομεράση I προκαλεί μονόκλωνα σπασίματα στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA, το πλασμίδιο μεταβαίνει στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Η ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους της δεν μπορεί να περάσει το ίδιο γρήγορα με την υπερελικωμένη διαμόρφωση τους πόρους της αгарόζης και εμφανίζεται πιο ψηλά όταν τρέχει σε gel ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 35). Η γραμμική διαμόρφωση εμφανίζεται ανάμεσα στην ανοιχτή κυκλική και στην υπερελικωμένη διαμόρφωση λόγω του ότι μπορεί να διαπερνά ανάμεσα από τους πόρους της αгарόζης πιο γρήγορα από την ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση (Εικόνα 39).



Εικόνα 39: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA.

## 2.2.2 Πειραματική διαδικασία

### 2.2.2.1 Απομόνωση πλασμιδίου

Αρχικά σε 100 ml θρεπτικού μέσου (1,5 gr LB broth + 1 gr NaCl), προστέθηκαν 100μl από διάλυμα αμπικιλίνης 100mg/ml ώστε η συγκέντρωσή της να είναι 100μg/ml. Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε πριν την προσθήκη της αμπικιλίνης. Κατόπιν 3 ml αυτού του θρεπτικού μέσου επιμολύνθηκαν με μικρή ποσότητα βακτηρίων *E. Coli* που έφεραν το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+. Αφού αναπτύχθηκε για 4 ώρες αυτή η μικρή καλλιέργεια έγινε επιμόλυνση με αυτήν στο υπόλοιπο θρεπτικό μέσο (100 ml). Η καλλιέργεια αφέθηκε για ανάδευση στις 210 στροφές σε θερμοκρασία 37°C για 12-13 ώρες. Στην συνέχεια τα βήματα που ακολούθησαν είναι τα εξής: Αρχικά πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 20 min στις 4000 στροφές, ακολούθησε απόχυση του υπερκείμενου και προσθήκη σε 50ml καλλιέργειας 4 ml Sol 1 (50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH=8.0, 10 mM EDTA pH=8.0) και κατόπιν διάλυση του ιζήματος. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη 8 ml Sol 2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) και απαλή ανάδευση. Ακολούθησε προσθήκη 6ml Sol 3 (5 M potassium acetate, 11,5 ml acetic acid), ανάδευση και φυγοκέντρηση για 20 min στις 5000 στροφές. Μετά την φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επανάληψη της προηγούμενης φυγοκέντρησης. Κατόπιν προστέθηκε 60 % του όγκου του υπερκείμενου που μετρήθηκε με προπανόλη (βρίσκεται στον πάγο) και έντονη ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 20 min στις 5000 στροφές, απόχυση υπερκείμενου και προσθήκη 50 % όγκου αιθανόλης 70 % (η οποία είναι στους -20°C) και ανάδευση. Τέλος ακολούθησε φυγοκέντρηση για 20 min στις 5000 στροφές, απόχυση υπερκείμενου και τοποθέτηση στον κλίβανο (37°C) για να στεγνώσει. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε διάλυση του ιζήματος σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) στο οποίο προστέθηκε ένζυμο RNase 10 μg/ml για την διάσπαση του RNA.

Έπειτα έγινε μέτρηση της ποσότητας και της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε και υπολογισμός του λόγου της απορρόφησης ABS 260/280 (στα 280 απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 το DNA). Όταν ο λόγος είναι >1,8 η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή. Τελικά το πλασμίδιο χωρίστηκε σε aliquots και τοποθετείται στους -20°C.

2.2.2.2 Topoisomerase relaxation assay

Αρχικά γίνεται η προετοιμασία του gel αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8 %, με διάλυση 0,8 gr αγαρόζης σε 100 ml TBE 1x (10mM Tris-Cl, Boric Acid, 0,5M EDTA pH=8), και απόχυσή του στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Ακολουθεί προετοιμασία των δειγμάτων της αντίδρασης (Πίνακας 3).

Κάθε φορά δοκιμαζόταν τα εκχυλίσματα σε συγκεντρώσεις 100, 200, 400, 800 µg/ml και τα κλάσματα καθαρών μορίων σε συγκεντρώσεις 20, 50, 100, 200 µg/ml για να προσδιοριστεί η επίδρασή τους στην ιδιότητα του ενζύμου τοποϊσομεράση I να χαλαρώνει το υπερελικωμένο πλασμίδιο προκαλώντας μονόκλωνα σπασίματα. Ως ισχυρός αναστολέας της τοποϊσομεράσης I χρησιμοποιήθηκε υδατικό εκχύλισμα κόκκινου σταφυλιού ποικιλίας Μανδηλαριάς σε συγκέντρωση 200 µg/ml, αναστέλλοντας κατά 89 % την δράση της τοποϊσομεράσης I (D. Stagos et al., 2005). 1,3 unit ενζύμου βρέθηκε ότι απαιτείται για να επιτευχθεί κατά 90% μετατροπή της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην χαλαρωμένη ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση στις συνθήκες του πειράματος.

Πίνακας 3: Δείγματα για μελέτη της δράσης των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων καθαρών μορίων

1. Αρνητικό Control	2. Θετικό Control	3. Δείκτης ισχυρής ανασταλτικής δράσης	4. 4 δείγματα με τις αντίστοιχες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ή κλάσματος
Μόνο το πλασμιδιακό DNA	Πλασμιδιακό DNA και 1,3 Units ένζυμο	Πλασμιδιακό DNA + 1,3 units ένζυμο + 200µg/ml υδατικό εκχύλισμα σταφυλιού Μανδηλαριάς	Πλασμιδιακό DNA + 1,3 units ένζυμο + εκχύλισμα, κλάσμα στην αντίστοιχη συγκέντρωση

Το μείγμα κάθε αντίδρασης (20 µL) περιείχε 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 % glycerol, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 µg Bluescript SK+ and 1.3 units ενζύμου τοποϊσομεράσης I. Για 10 δείγματα προετοιμαζόταν 100µl Reaction Mix το οποίο περιείχε: 10 µl Reaction Buffer (50mM TrisHCl pH=7,5, 50mM NaCl, 0,1mM EDTA ), 10 µl DTT (1mM), 80 µl Glycerol (20%) και 1,3 µl ένζυμο το οποίο τοποθετούνταν πάντα τελευταίο. Κάθε αντίδραση περιλάμβανε τα εξής δείγματα: το αρνητικό control (πλασμιδιακό DNA), το θετικό control (πλασμιδιακό DNA + ένζυμο), το δείκτη ισχυρής ανασταλτικής δράσης (υδατικό εκχύλισμα σταφυλιού Μανδηλαριάς + πλασμιδιακό DNA + ένζυμο) και τέσσερα δείγματα (4 συγκεντρώσεις) για το κάθε υδατικό ή μεθανολικό εκχύλισμα ή κλάσμα καθαρού μορίου (εκχύλισμα ή κλάσμα καθαρού μορίου + πλασμιδιακό DNA +ένζυμο).



Τα δείγματα τοποθετούνταν στους 37°C για 15 min. Στη συνέχεια η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 5 μl Loading Buffer (Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) και η ανάλυση γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης στα 70 V για 1h. Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε 250ml διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/ml) για 30 min και ξεβαφόταν σε 250ml απιονισμένο νερό για 30 min. Τελικά το gel φωτογραφιζόταν κάτω από UV. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.

Τα εκχύλισματα και τα κλάσματα καθαρών μορίων έχουν δοκιμαστεί, σε προηγούμενη μελέτη, όπου έχει βρεθεί ότι δεν επηρεάζουν την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA όταν επωάζονταν μόνα τους με το πλασμιδιακό DNA.

### 2.2.3 Υπολογισμοί

Κάθε πείραμα πραγματοποιούνταν 3 φορές για κάθε εκχύλισμα ή κλάσμα καθαρών μορίων. Η επεξεργασία των φωτογραφιών έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Gel-Pro, με το οποίο υπολογίστηκαν με βάση την οπτική πυκνότητα τα ποσοστά της υπερελικωμένης και της ανοιχτής κυκλικής διαμόρφωσης για κάθε συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματός ή κλάσματος καθαρού μορίου. Από τα ποσά αυτά υπολογιζόταν το ποσοστό της αναστολής/ επαγωγής για κάθε δείγμα με τη βοήθεια του τύπου:

$$\% \text{ αναστολή/ επαγωγή} = \frac{S_p - S}{S_p - S_o} \times 100$$

Όπου  $S_p$  είναι το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής στο θετικό control, δείγμα (πλασμίδιο DNA με 1,3unit ενζύμου),  $S$  είναι το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής στο εξεταζόμενο δείγμα που περιέχει το πλασμίδιο DNA με το ένζυμο και το προς εξέταση εκχύλισμα και  $S_o$  είναι το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής στο αρνητικό control, δείγμα (μόνο πλασμίδιο DNA). Από τα τρία ποσοστά αναστολής/ επαγωγής για κάθε εκχύλισμα ή καθαρό μόριο βρέθηκε η μέση τιμή ( $\bar{x}$ ) καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE) για το καθένα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την χρήση του προγράμματος SPSS.

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Επίδραση στη δράση της τοποϊσομεράσης I 11 υδατικών εκχυλίσμάτων φυτών της οικογένειας Leguminosae

Από τα 11 υδατικά εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας *Leguminosae* που μελετήθηκαν, επίδραση στην τοποϊσομεράση I εμφάνισαν μόνο τα 2 (Πίνακας 4). Σημαντική επίδραση στη δράση της τοποϊσομεράσης I εμφάνισαν τα υδατικά εκχυλίσματα πόας των φυτών *Lathyrus laxiflorus* και *Vicia faba* (Πίνακας 4). Συγκεκριμένα το εκχύλισμα πόας του φυτού *Lathyrus laxiflorus* στις συγκεντρώσεις 100, 200, 400 και 800  $\mu\text{g/ml}$  εμφάνισε 55 %, 57 %, 60 % και 64 % στατιστικά σημαντική αναστολή της δράσης της τοποϊσομεράσης I αντίστοιχα (Πίνακας 4) (Εικόνα 40, Γράφημα 1). Λόγω της ισχυρής ανασταλτικής δράσης του εκχυλίσματος αυτού, δοκιμάστηκε η δράση του σε μικρότερες συγκεντρώσεις 5, 20 και 50  $\mu\text{g/ml}$  όπου παρουσίασε 23 % και 49 % στατιστικά σημαντική αναστολή στις συγκεντρώσεις 20 και 50  $\mu\text{g/ml}$  αντίστοιχα (Εικόνα 41, Γράφημα 2). Το εκχύλισμα πόας του φυτού *Vicia faba* εμφάνισε 15 % και 32 % στατιστικά σημαντική αναστολή στις συγκεντρώσεις 200 και 400  $\mu\text{g/ml}$  αντίστοιχα ενώ στα 800  $\mu\text{g/ml}$  εμφάνιζε επαγωγική επίδραση στη δράση της τοποϊσομεράσης I με ποσοστό επαγωγής 74 % (Πίνακας 4), (Εικόνα 42, Γράφημα 3).

Σε αντίθεση με τα προηγούμενα εκχυλίσματα στις συγκεντρώσεις 100, 200, 400 και 800  $\mu\text{g/ml}$  δεν εμφάνισαν καμία επίδραση στην δράση της τοποϊσομεράσης I τα υδατικά εκχυλίσματα από τα φυτά *Phaseolus vulgaris* (σπέρματα και πόα) (Εικόνες 43 και 44), *Lathyrus clymenum* (σπέρματα) (Εικόνα 45), *Lupinus albus* (σπέρματα και πόα) (Εικόνα 46), *Lotus edulis* (σπέρματα και πόα) (Εικόνα 47) και *Lens culinaris* (σπέρματα και πόα) (Εικόνα 48) (Πίνακας 4).

#### 3.2 Επίδραση στη δράση της τοποϊσομεράσης I 2 μεθανολικών εκχυλίσμάτων πόας από τα φυτά *Vicia faba* και *Lotus edulis*

Τα 2 μεθανολικά εκχυλίσματα πόας από τα φυτά *Vicia faba* και *Lotus edulis* που μελετήθηκαν, εμφάνισαν σημαντική επίδραση στην δράση της τοποϊσομεράσης I κυρίως στις μεγαλύτερες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (400 και 800  $\mu\text{g/ml}$ ) (Πίνακας 5). Συγκεκριμένα το μεθανολικό εκχύλισμα από το φυτό *Lotus edulis* στις συγκεντρώσεις 400 και 800  $\mu\text{g/ml}$  εμφάνισε αναστολή 20 % και 24 % αντίστοιχα (Εικόνα 49, Γράφημα 4) ενώ το μεθανολικό εκχύλισμα από το φυτό *Vicia faba* εμφάνισε αναστολή 21 % μόνο στα 800  $\mu\text{g/ml}$  (Εικόνα 50, Γράφημα 4).

### **3.3 Επίδραση στη δράση της τοποϊσομεράσης I 10 κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Vicia faba***

Από τα 10 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό *Vicia faba* πιο ισχυρή επίδραση στην δράση της τοποϊσομεράσης I εμφάνισαν τα κλάσματα Vfm 32-34, Vfm 76-81, Vfm 155-160, Vfm 6-9, Vfm 13-15, Vfm 25-28 και Vfm 171-176 (Πίνακας 6). Η αναλογία και οι χημικές δομές των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται σε κάθε κλάσμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7 και στην Εικόνα 51 (Παράρτημα). Τα κλάσματα Vfm 92-97, Vfm 115, Vfm 135-137, που ήταν τα πιο ασθενή, παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αναστολή 12 %, 21 %, 22 % αντίστοιχα μόνο στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση, 200  $\mu\text{g/ml}$  (Πίνακας 6) (Εικόνες 52, 53, Γραφήματα 5, 6, 7). Ακολούθως τα κλάσματα Vfm 32-34 και Vfm 76-81 παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική αναστολή 12%, 20% και 16%, 30% αντίστοιχα στις συγκεντρώσεις 100 και 200  $\mu\text{g/ml}$  (Πίνακας 6), (Εικόνα 54, Γραφήματα 8, 9) ενώ τα κλάσματα Vfm 155-160, Vfm 6-9, Vfm 13-15 επηρέαζαν την δράση της τοποϊσομεράσης I σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (20, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ ) (Πίνακας 6) (Εικόνες 55, 56, Γράφημα 10, 11, 12). Τα πιο ισχυρά από όλα τα κλάσματα ήταν τα Vfm 25-28 και Vfm 171-176 (Πίνακας 6) αφού στην χαμηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (20  $\mu\text{g/ml}$ ) εμφάνιζαν ποσοστά αναστολής 71% και 79% αντίστοιχα (Εικόνα 57, Γραφήματα 13, 14).

### **3.4 Επίδραση στη δράση της τοποϊσομεράσης I 4 κλασμάτων καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Lotus edulis***

Από τα 4 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό *Lotus edulis* πιο ισχυρή επίδραση στη δράση της τοποϊσομεράσης I εμφάνισαν τα κλάσματα Le C2, Le D3 και Le D6 (Πίνακας 8). Οι χημικές δομές των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται σε κάθε κλάσμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9 και στην Εικόνα 58 (Παράρτημα). Το κλάσμα Le C6, που ήταν το πιο ασθενές παρουσίασε στατιστικά σημαντική αναστολή 26 % μόνο στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση, 200  $\mu\text{g/ml}$  (Πίνακας 8) (Εικόνα 59, Γράφημα 15). Ακολούθως το κλάσμα Le C2 εμφάνιζε μεγαλύτερη επίδραση στην δράση της τοποϊσομεράσης I με στατιστικά σημαντικά ποσοστά αναστολής 22%, 28%, 61% στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$  αντίστοιχα (Πίνακας 8) (Εικόνα 60, Γράφημα 16). Πιο ισχυρά από όλα τα κλάσματα ήταν τα Le D3 και Le D6 (Πίνακας 8) αφού στην χαμηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (20  $\mu\text{g/ml}$ ) εμφάνιζαν ποσοστά αναστολής 63 % και 66 % αντίστοιχα (Εικόνα 61, Γραφήματα 17, 18).

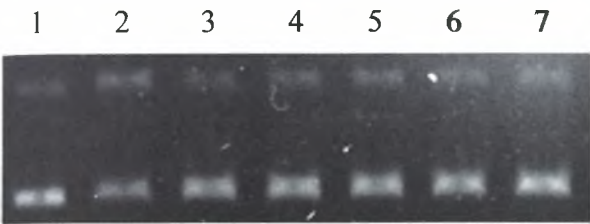
Υδατικά εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας Leguminosae

Πίνακας 4: Ποσοστά % αναστολής/επαγωγής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από υδατικά εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας Leguminosae

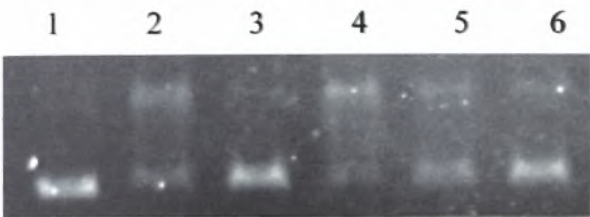
Φυτά της οικογένειας Leguminosae	Τμήμα φυτού	% Αναστολή/Επαγωγή			
		100µg/m	200µg/m	400µg/m	800µg/m
		l	l	l	l
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Σπέρματα	NA	NA	NA	NA
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Πόα	NA	NA	NA	NA
<i>Lathyrus laxiflorus</i> subsp. <i>Laxiflorus</i>	Πόα	55±4*	57±3*	60±4*	64±4*
<i>Vicia faba</i>	Πόα	11±2	15±2*	32±4*	-74±8*
<i>Lens culinaris</i>	Πόα	NA	NA	NA	NA
<i>Lens culinaris</i>	Σπέρματα	NA	NA	NA	NA
<i>Lathyrus clymenum</i>	Σπέρματα	NA	NA	NA	NA
<i>Lotus edulis</i>	Πόα	NA	NA	NA	NA
<i>Lotus edulis</i>	Σπέρματα	NA	NA	NA	NA
<i>Lupinus albus</i>	Σπέρματα	NA	NA	NA	NA
<i>Lupinus albus</i>	Πόα	NA	NA	NA	NA

Οι τιμές αποτελούν την μέση τιμή ± SD (τυπική απόκλιση) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα ποσοστά με \* είναι στατιστικά σημαντικά, NA=No Activity

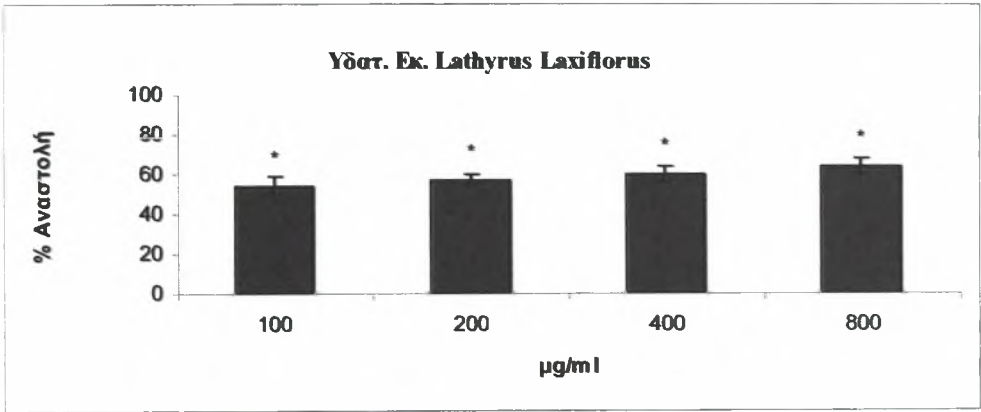
1. Πόα *Lathyrus laxiflorus* subsp. *Laxiflorus*



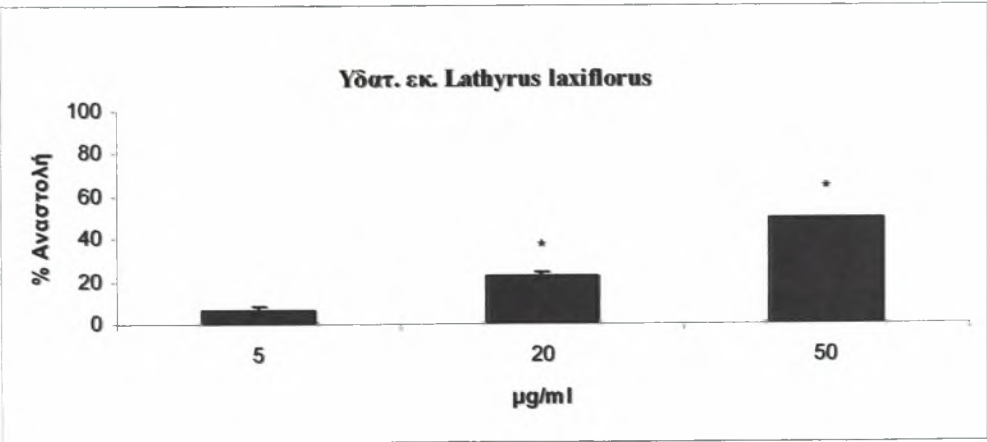
Εικόνα 40: Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος από πόα *Lathyrus laxiflorus* (100, 200, 400, 800 μg/ml ) στη δράση της τοποϊσομεράσης I



Εικόνα 41: Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος από πόα *Lathyrus laxiflorus* (5, 20, 50 μg/ml) στη δράση της τοποϊσομεράσης I



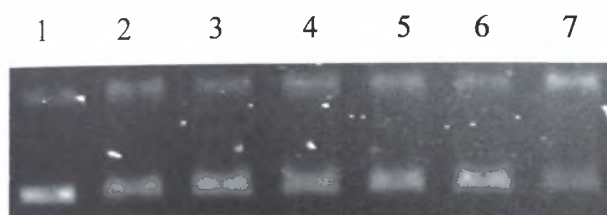
Γράφημα 1: Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από το υδατ. Εκ. *Lathyrus laxiflorus* (100, 200, 400, 800 μg/ml)



Γράφημα 2: Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από το υδατ. Εκ. *Lathyrus laxiflorus* (5, 20, 50 μg/ml)

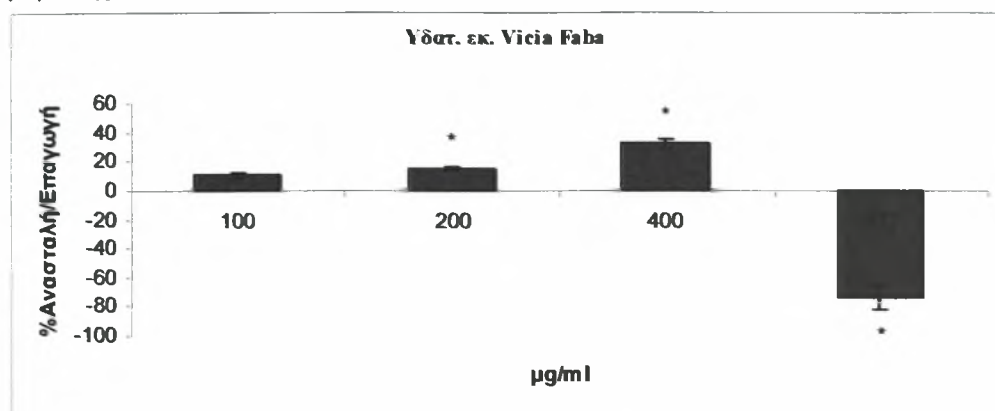


## 2. Πόα *Vicia faba*



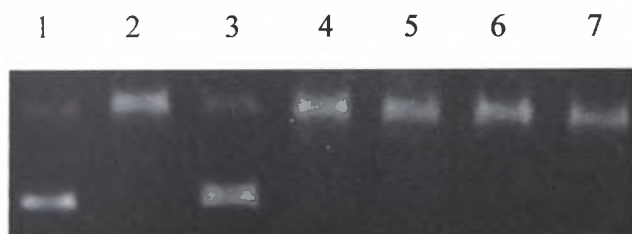
- 1: 1μg plasmid
- 2: 1μg plasmid + 1 unit TopoI
- 3: 1μg plasmid + 1 unit TopoI + 200μg/ml Yδ.εκ. Μανδηλ.
- 4: 1μg plasmid + 1 unit TopoI + 100μg/ml Πόα *Vicia faba*
- 5: 1μg plasmid + 1 unit TopoI + 200μg/ml Πόα *Vicia faba*
- 6: 1μg plasmid + 1 unit TopoI + 400μg/ml Πόα *Vicia faba*
- 7: 1μg plasmid + 1 unit TopoI + 800μg/ml Πόα *Vicia faba*

**Εικόνα 42:** Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος από πόα *Vicia faba* στη δράση της τοποϊσομεράσης I



**Γράφημα 3:** Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από το υδατ. Εκ. *Vicia faba* (100, 200, 400, 800 μg/ml)

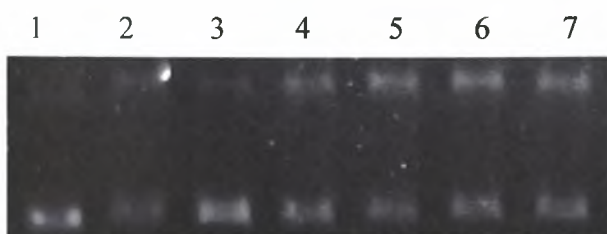
## 3. Σπέρματα *Phaseolus vulgaris*



- 1: 1μg plasmid
- 2: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI
- 3: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200μg/ml Yδ. εκ.Μανδηλ.
- 4: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 100μg/ml Σπ. *P.vulgaris*
- 5: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200μg/ml Σπ. *P.vulgaris*
- 6: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 400μg/ml Σπ. *P.vulgaris*
- 7: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 800μg/ml Σπ. *P.vulgaris*

**Εικόνα 43:** Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος από σπέρματα *Phaseolus vulgaris* στη δράση της τοποϊσομεράσης I

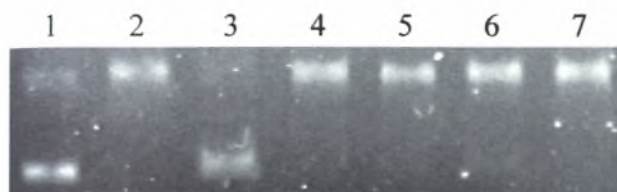
## 4. Πόα *Phaseolus vulgaris*



- 1: 1μg plasmid
- 2: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI
- 3: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200μg/ml Yδ. εκ. Μανδηλ.
- 4: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 100μg/ml Πόα *P.vulgaris*
- 5: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200μg/ml Πόα *P.vulgaris*
- 6: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 400μg/ml Πόα *P.vulgaris*
- 7: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 800μg/ml Πόα *P.vulgaris*

**Εικόνα 44:** Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος από πόα *Phaseolus vulgaris* στη δράση της τοποϊσομεράσης I

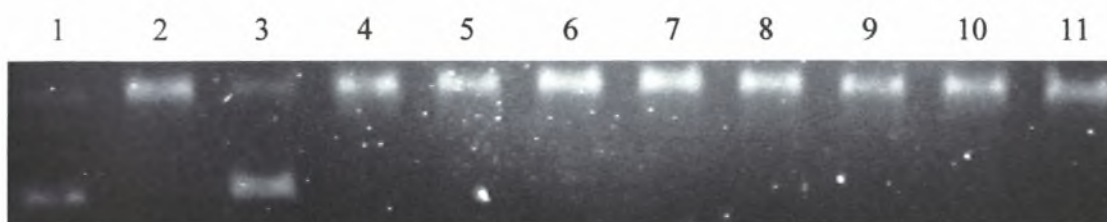
### 5. Σπέρματα *Lathyrus clymenum*



- 1: 1μg plasmid
- 2: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI
- 3: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200μg/ml Yδ. εκ. Μανδηλ.
- 4: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 100μg/ml Σπ. *L. clymenum*
- 5: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200μg/ml Σπ. *L. clymenum*
- 6: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 400μg/ml Σπ. *L. clymenum*
- 7: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 800μg/ml Σπ. *L. clymenum*

**Εικόνα 45:** Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος από σπέρματα *Lathyrus clymenum* στη δράση της τοποϊσομεράσης I

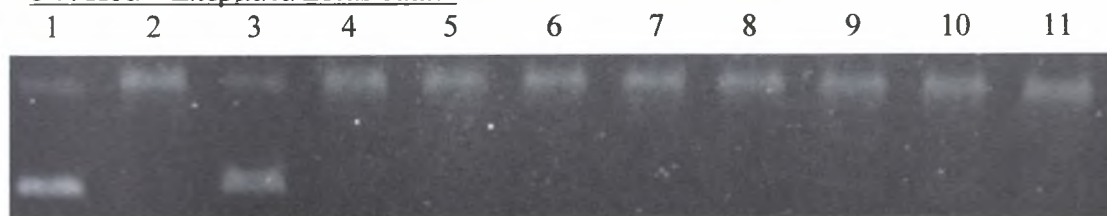
### 6-7. Σπέρματα – Πόα *Lupinus albus*



- 1: 1μg plasmid
- 2: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI
- 3: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200μg/ml Yδ. Εκ. Μανδηλ.
- 4: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 100μg/ml Σπ. *Lupinus albus*
- 5: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200μg/ml Σπ. *Lupinus albus*
- 6: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 400μg/ml Σπ. *Lupinus albus*
- 7: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 800μg/ml Σπ. *Lupinus albus*
- 8: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 100μg/ml Πόα *Lupinus albus*
- 9: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200μg/ml Πόα *Lupinus albus*
- 10: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 400μg/ml Πόα *Lupinus albus*
- 11: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 800μg/ml Πόα *Lupinus albus*

**Εικόνα 46:** Επίδραση των υδατικών εκχυλίσμάτων από σπέρματα και πόα *Lupinus albus* στη δράση της τοποϊσομεράσης I

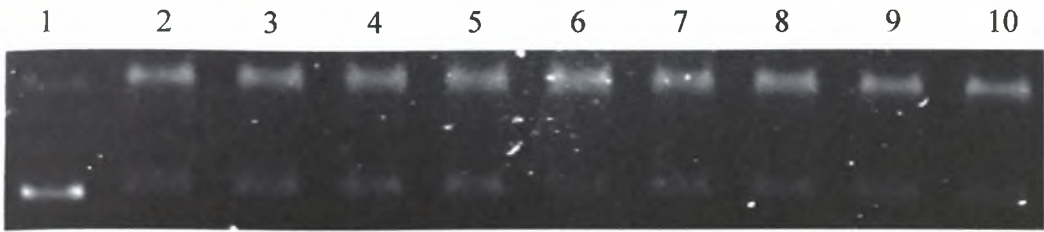
### 8-9. Πόα – Σπέρματα *Lotus edulis*



- 1: 1μg plasmid
- 2: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI
- 3: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200μg/ml Yδ. Εκ. Μανδηλ.
- 4: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 100μg/ml Πόα *Lotus edulis*
- 5: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200μg/ml Πόα *Lotus edulis*
- 6: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 400μg/ml Πόα *Lotus edulis*
- 7: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 800μg/ml Πόα *Lotus edulis*
- 8: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 100μg/ml Σπ. *Lotus edulis*
- 9: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200μg/ml Σπ. *Lotus edulis*
- 10: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 400μg/ml Σπ. *Lotus edulis*
- 11: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 800μg/ml Σπ. *Lotus edulis*

**Εικόνα 47:** Επίδραση των υδατικών εκχυλίσμάτων από πόα και σπέρματα *Lotus edulis* στη δράση της τοποϊσομεράσης I

10-11. Πόα – Σπέρματα *Lens culinaris*



- 1: 1μg plasmid  
2: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI  
3: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 100μg/ml Πόα *Lens culinaris*  
4: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200μg/ml Πόα *Lens culinaris*  
5: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 400μg/ml Πόα *Lens culinaris*  
6: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 800μg/ml Πόα *Lens culinaris*  
7: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 100μg/ml Σπ. *Lens culinaris*  
8: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200μg/ml Σπ. *Lens culinaris*  
9: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 400μg/ml Σπ. *Lens culinaris*  
10: 1μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 800μg/ml Σπ. *Lens culinaris*

Εικόνα 48: Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων από πόα και σπέρματα *Lens culinaris* στη δράση της τοποϊσομεράσης I

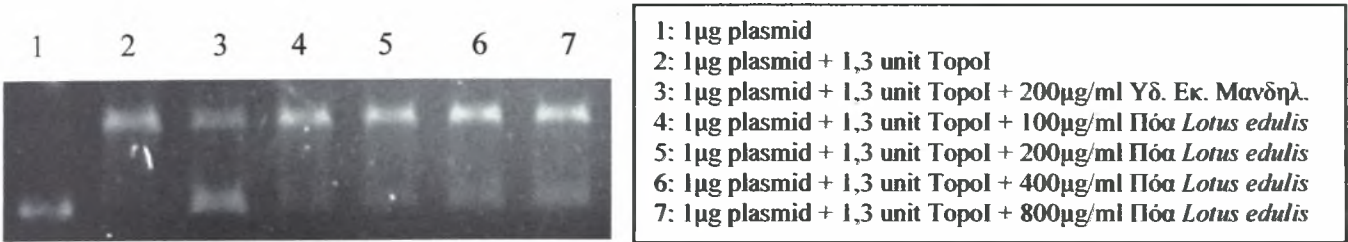
Μεθανολικά εκχυλίσματα από τα φυτά *Vicia faba* και *Lotus edulis*

Πίνακας 5: Ποσοστά % αναστολής/επαγωγής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από μεθανολικά εκχυλίσματα από τα φυτά *Vicia faba* και *Lotus edulis*

Φυτό	% Αναστολή/Επαγωγή			
	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml	800 µg/ml
<i>Lotus edulis</i>	8±3	14±2	20±1*	24±1*
<i>Vicia faba</i>	3±1	4±1	4±1	21±1*

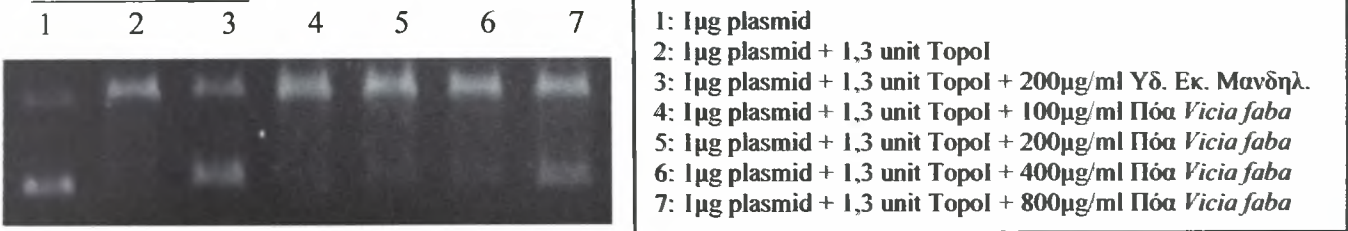
Οι τιμές αποτελούν την μέση τιμή ± SD (τυπική απόκλιση) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα ποσοστά με \* είναι στατιστικά σημαντικά, NA=No Activity

1. Πόα *Lotus edulis*

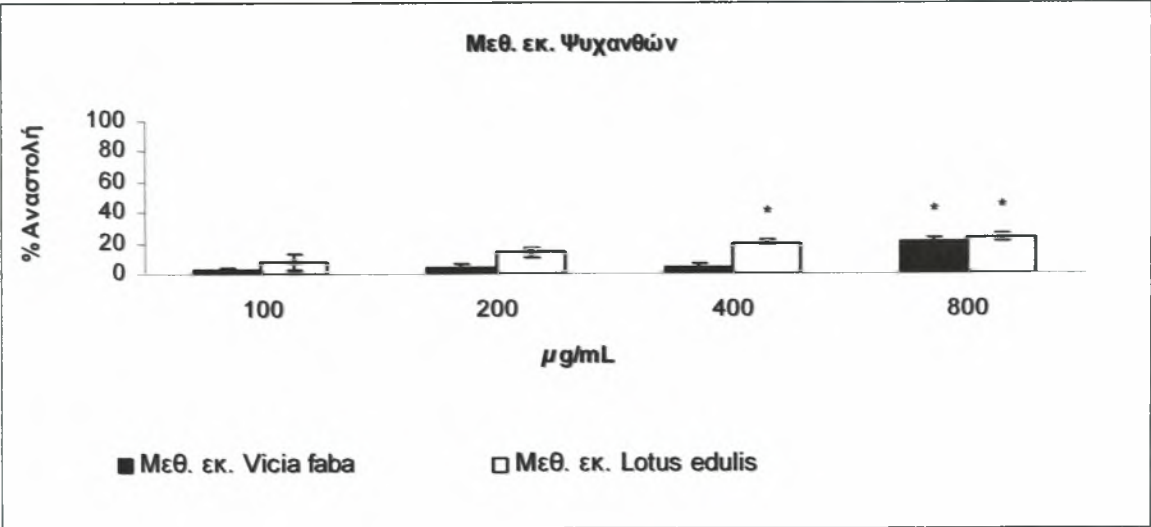


Εικόνα 49: Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος από πόα *Lotus edulis* στη δράση της τοποϊσομεράσης I

2. Πόα *Vicia faba*



Εικόνα 50: Επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος από πόα *Vicia faba* στη δράση της τοποϊσομεράσης I



Γράφημα 4: Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από τα Μεθαν. Εκ. *Vicia faba* και *Lotus edulis* (100, 200, 400, 800 µg/ml)

Κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό *Vicia faba*

Πίνακας 6: Ποσοστά % αναστολής/επαγωγής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Vicia faba*.

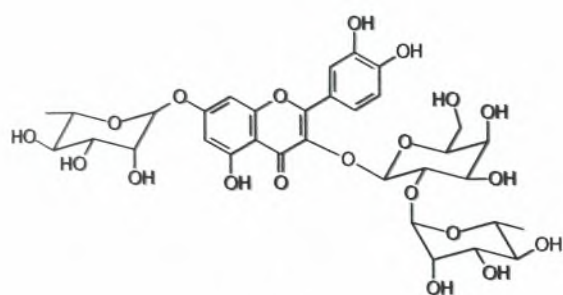
		% Αναστολή/Επαγωγή της δράσης της Τοποϊσομεράσης I			
Φυτό από το οποίο απομονώθηκαν τα κλάσματα	Συγκεντρώσεις(μg/ml)	20	50	100	200
<i>Vicia faba</i>	Vfm 92-97	NA	NA	NA	12 ± 2*
	Vfm 115	NA	NA	NA	21 ± 1*
	Vfm 135-137	NA	NA	9 ± 5	22 ± 1*
	Vfm 32-34	NA	10 ± 2	12 ± 0.3*	20 ± 0.4*
	Vfm 76-81	8 ± 2	13 ± 2	16 ± 2*	30 ± 3*
	Vfm 155-160	17 ± 2*	22 ± 2*	39 ± 3*	50 ± 2*
	Vfm 6-9	12 ± 2	28 ± 4*	39 ± 2*	51 ± 3*
	Vfm 13-15	30 ± 4*	39 ± 3*	39 ± 4*	53 ± 5*
	Vfm 25-28	71 ± 4*	75 ± 3*	76 ± 1*	79 ± 3*
	Vfm 171-176	79 ± 3*	83 ± 3*	83 ± 4*	94 ± 6*

Οι τιμές αποτελούν την μέση τιμή ± SD (τυπική απόκλιση) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα ποσοστά με \* είναι στατιστικά σημαντικά, NA=No Activity

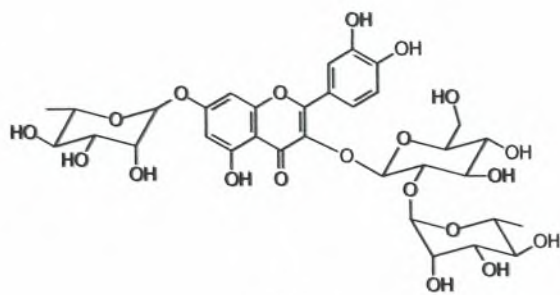
Πίνακας 7: Αναλογία φαινολικών ενώσεων σε κάθε κλάσμα

Κλάσμα	Ενώσεις	Αναλογία
Vfm 92-97	5:10:6	4:1:2
Vfm 115	Μείγμα μη πολικών συστατικών	-
Vfm 135-137	7:8	2:1
Vfm 32-34	3:4	2:1
Vfm 76-81	5:6	1:4
Vfm 155-160	9:10	1:1
Vfm 6-9	1:2:3	3:1:3
Vfm 13-15	1:2	2:1
Vfm 25-28	3:4	3:1
Vfm 171-176	5:10	2:3

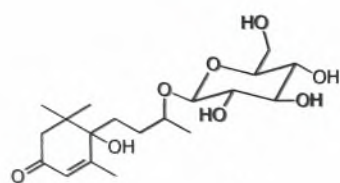




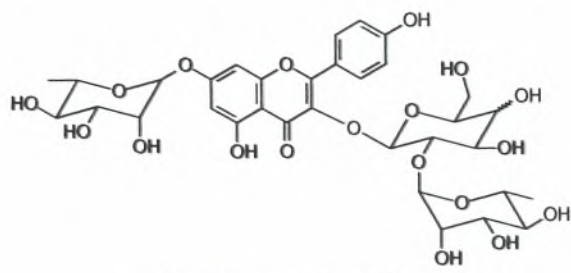
1



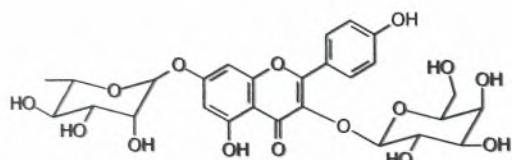
2



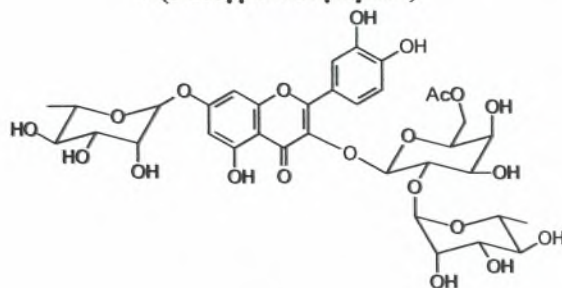
3



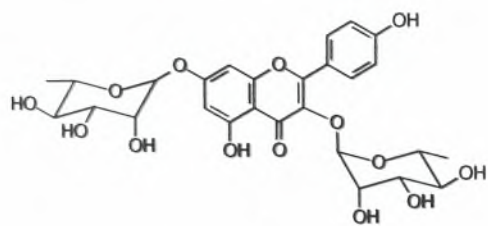
4 (Μείγμα ισομερών)



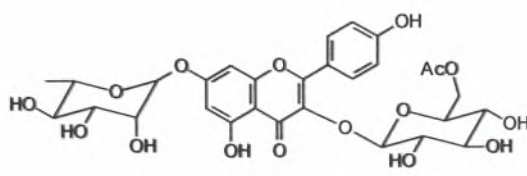
5



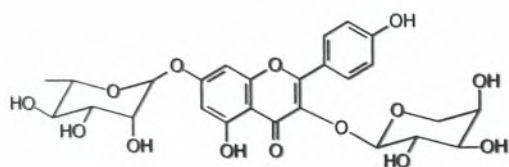
6



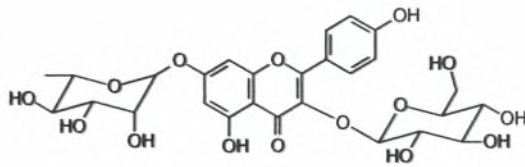
7



8



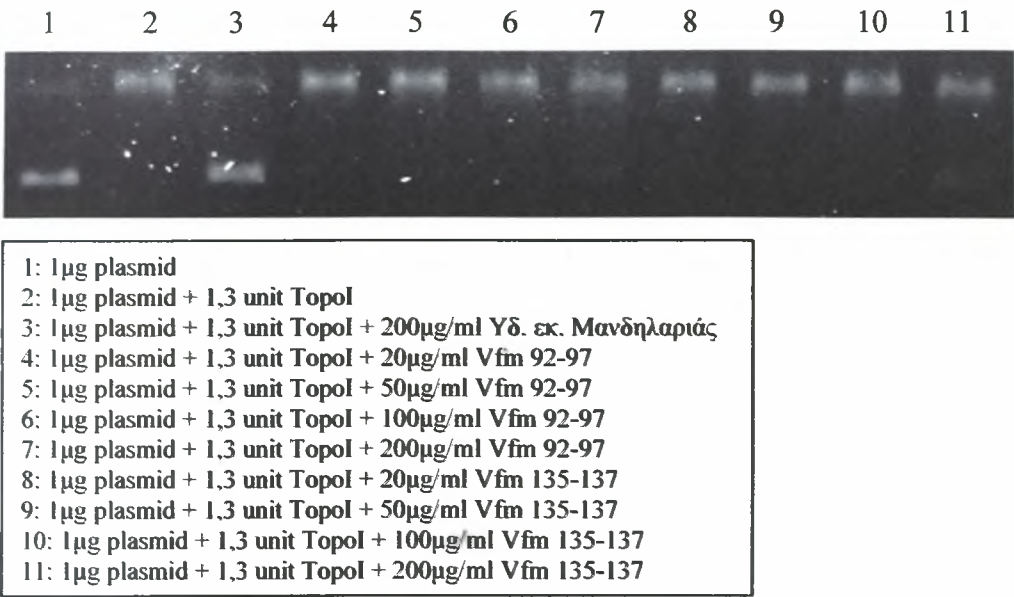
9



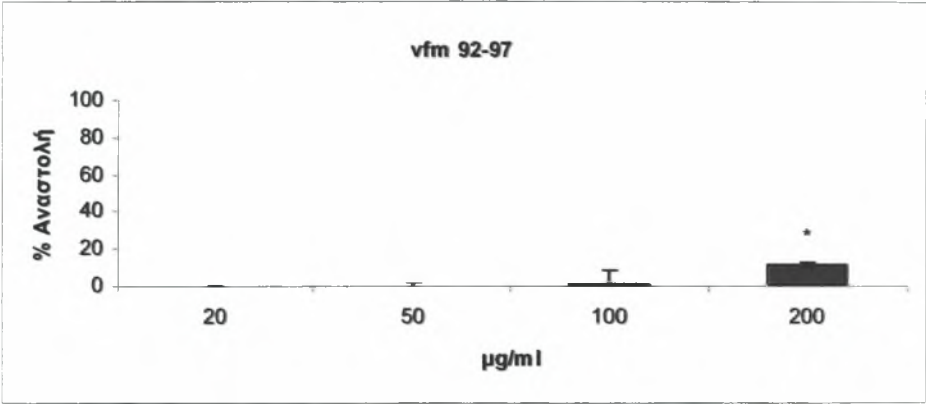
10

Εικόνα 51: Χημικές δομές φαινολικών ενώσεων

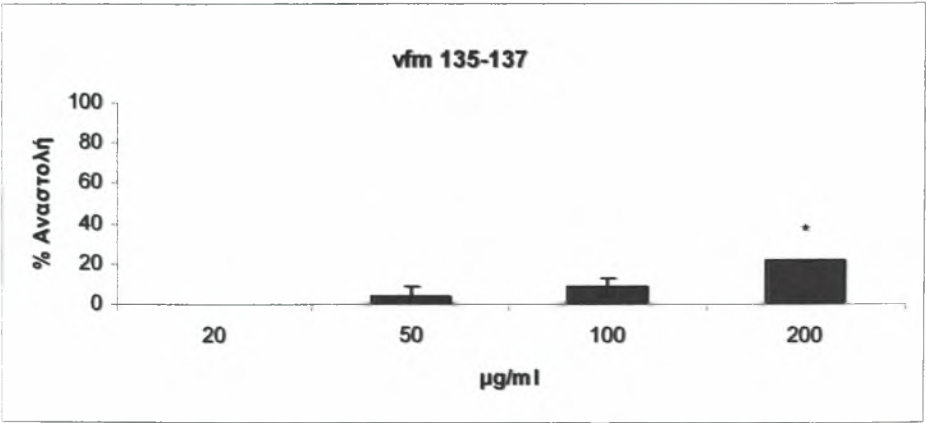
1-2. Vfm 92-97 και Vfm 135-137



Εικόνα 52: Επίδραση των κλασμάτων καθαρών μορίων Vfm 92-97 και Vfm 135-137 στη δράση της τοποϊσομεράσης I

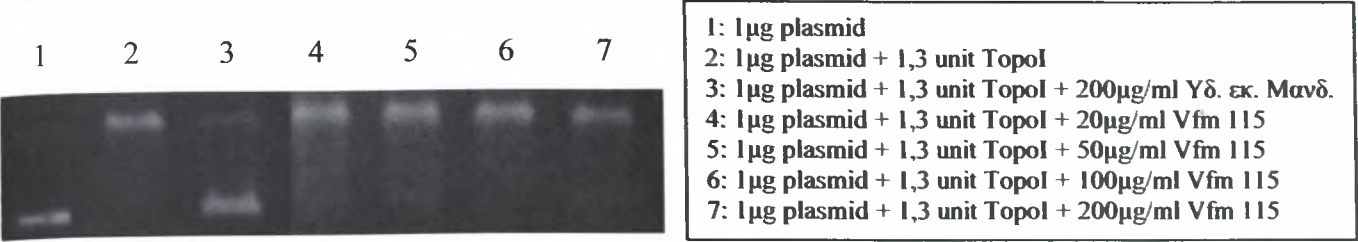


Γράφημα 5: Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο Vfm 92-97

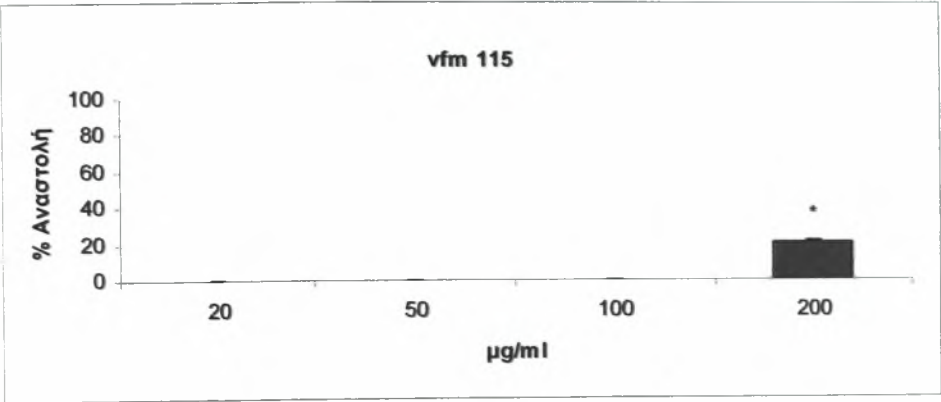


Γράφημα 6: Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο Vfm 135-137

3. Vfm 115

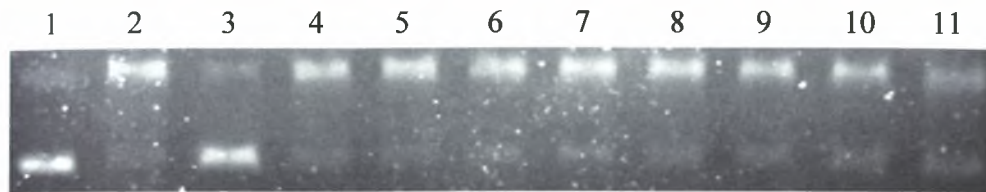


Εικόνα 53: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου Vfm 115 στη δράση της τοποϊσομεράσης I



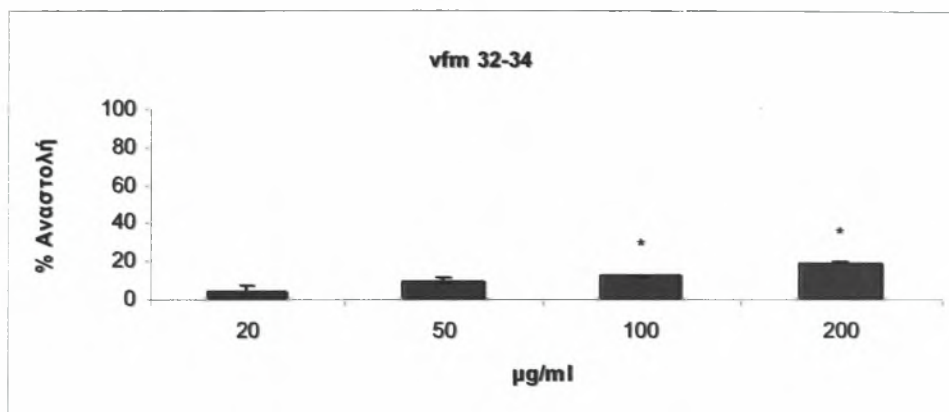
Γράφημα 7: Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο Vfm 115

#### 4-5. Vfm 32-34 και Vfm 76-81

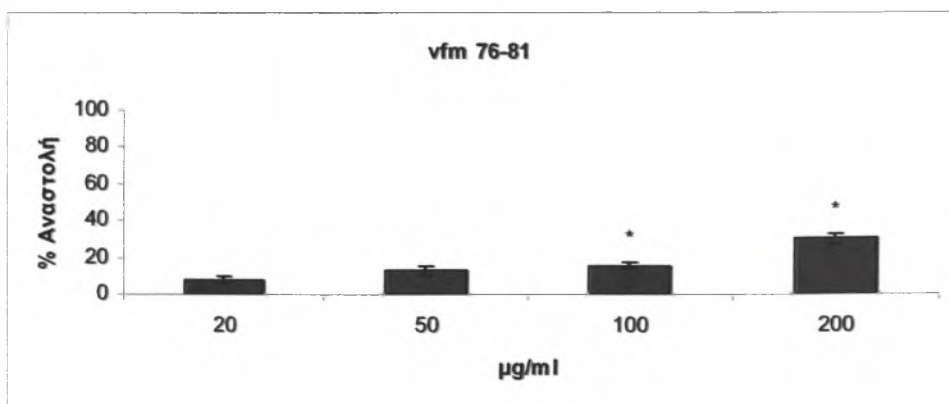


- 1: 1 μg plasmid
- 2: 1 μg plasmid + 1,3 unit TopoI
- 3: 1 μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200 μg/ml Yδ. εκ. Μανδηλαριάς
- 4: 1 μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 20 μg/ml Vfm 32-34
- 5: 1 μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 50 μg/ml Vfm 32-34
- 6: 1 μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 100 μg/ml Vfm 32-34
- 7: 1 μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200 μg/ml Vfm 32-34
- 8: 1 μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 20 μg/ml Vfm 76-81
- 9: 1 μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 50 μg/ml Vfm 76-81
- 10: 1 μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 100 μg/ml Vfm 76-81
- 11: 1 μg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200 μg/ml Vfm 76-81

**Εικόνα 54:** Επίδραση των κλασμάτων καθαρών μορίων Vfm 32-34 και Vfm 76-81 στη δράση της τοποϊσομεράσης I

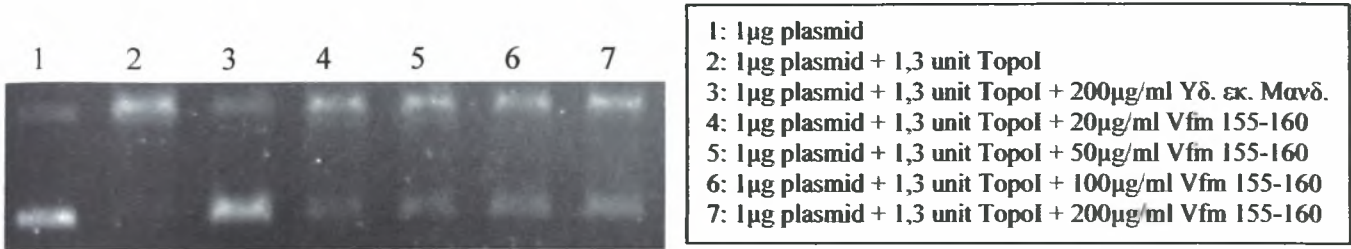


**Γράφημα 8:** Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο Vfm 32-34

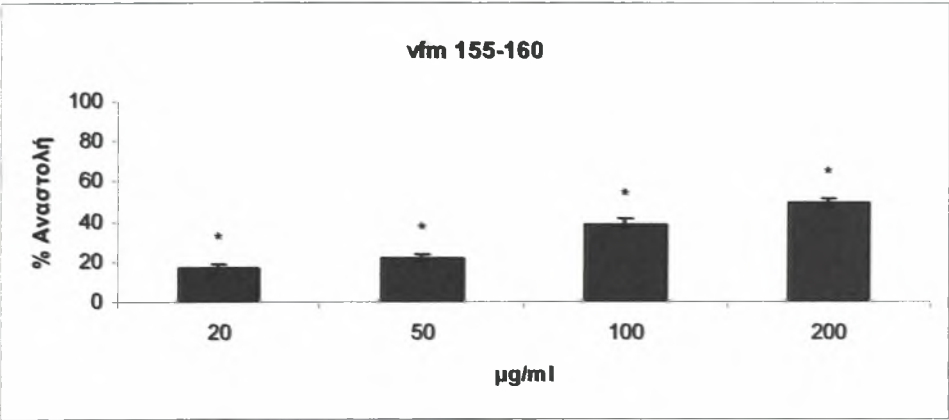


**Γράφημα 9:** Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο Vfm 76-81

6. Vfm 155-160



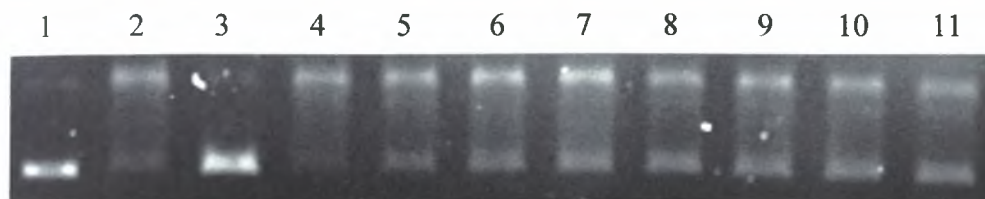
Εικόνα 55: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου Vfm 155-160 στη δράση της τοποϊσομεράσης I



Γράφημα 10: Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο Vfm 155-160

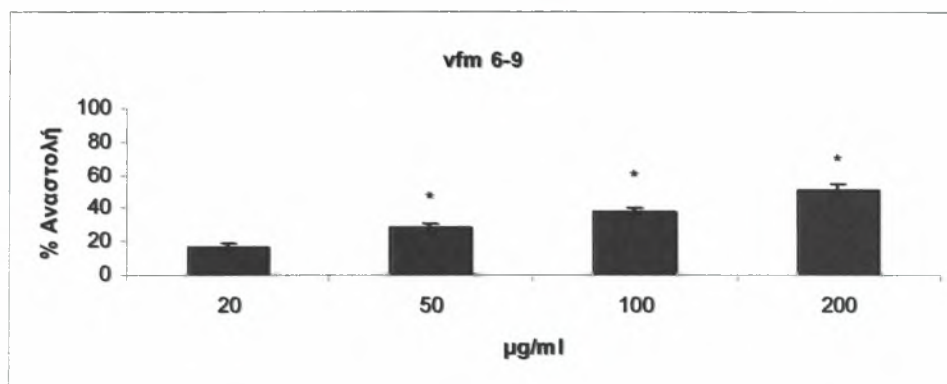


## 7-8. Vfm 6-9 και Vfm 13-15

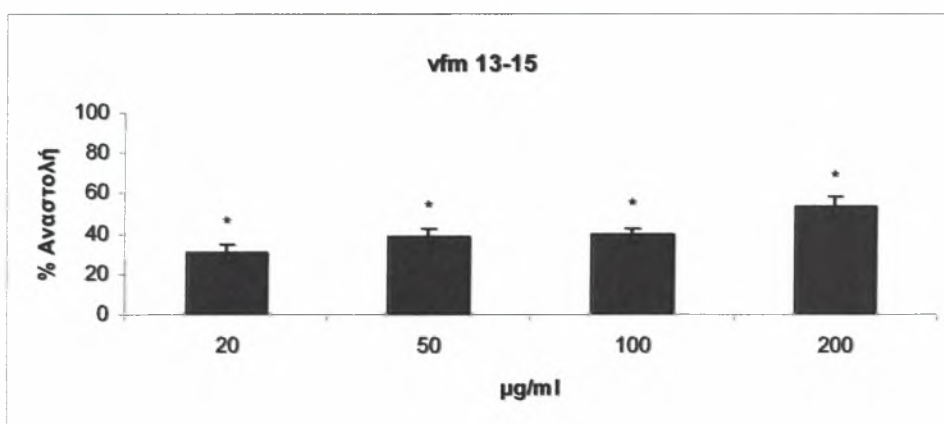


- 1: 1 µg plasmid
- 2: 1 µg plasmid + 1,3 unit TopoI
- 3: 1 µg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200 µg/ml Yδ. εκ. Μανδηλαριάς
- 4: 1 µg plasmid + 1,3 unit TopoI + 20 µg/ml Vfm 6-9
- 5: 1 µg plasmid + 1,3 unit TopoI + 50 µg/ml Vfm 6-9
- 6: 1 µg plasmid + 1,3 unit TopoI + 100 µg/ml Vfm 6-9
- 7: 1 µg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200 µg/ml Vfm 6-9
- 8: 1 µg plasmid + 1,3 unit TopoI + 20 µg/ml Vfm 13-15
- 9: 1 µg plasmid + 1,3 unit TopoI + 50 µg/ml Vfm 13-15
- 10: 1 µg plasmid + 1,3 unit TopoI + 100 µg/ml Vfm 13-15
- 11: 1 µg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200 µg/ml Vfm 13-15

**Εικόνα 56:** Επίδραση των κλασμάτων καθαρών μορίων Vfm 6-9 και Vfm 13-15 στη δράση της τοποϊσομεράσης I

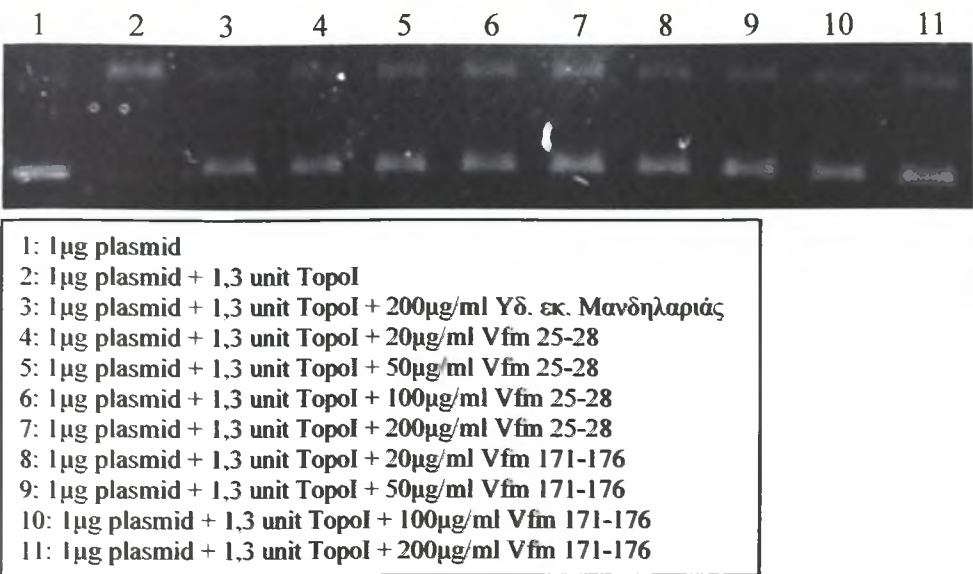


**Γράφημα 11:** Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο Vfm 6-9

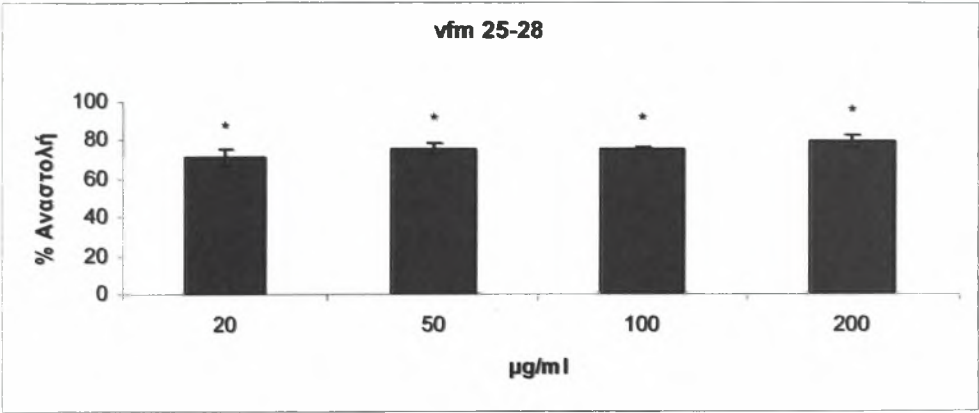


**Γράφημα 12:** Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο Vfm 13-15

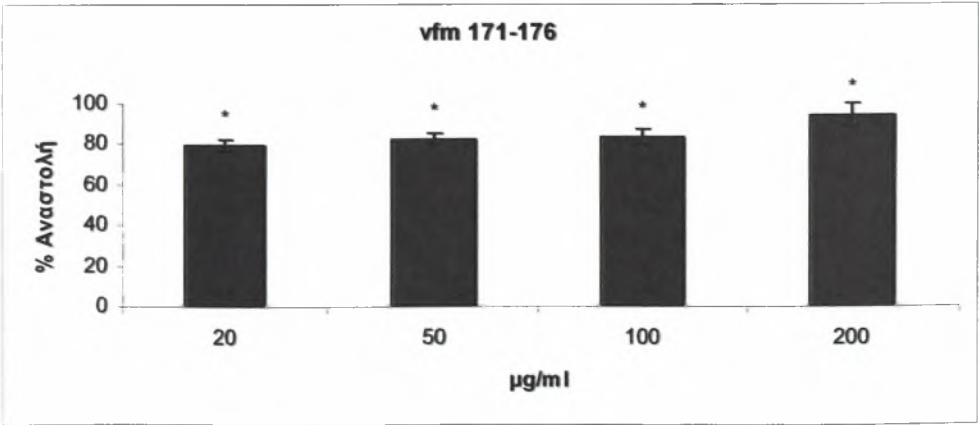
9-10. Vfm 25-28 και Vfm 171-176



Εικόνα 57: Επίδραση των κλασμάτων καθαρών μορίων Vfm 25-28 και Vfm 171-176 στη δράση της τοποϊσομεράσης I



Γράφημα 13: Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο Vfm 25-28



Γράφημα 14: Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο Vfm 171-176

Κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό *Lotus edulis*

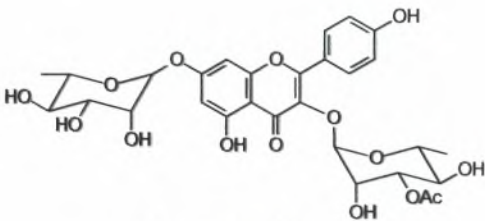
Πίνακας 8: Ποσοστά % αναστολής/επαγωγής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Lotus edulis*

Φυτό από το οποίο απομονώθηκαν τα κλάσματα	Συγκεντρώσεις(μg/ml)	% Αναστολή/Επαγωγή της δράσης της Τοποϊσομεράσης I			
		20	50	100	200
<i>Lotus edulis</i>	Le C6	NA	NA	10 ± 1	26 ± 1*
	Le C2	10 ± 2	22 ± 1*	28 ± 2*	61 ± 2*
	Le D3	63 ± 5*	72 ± 4*	67 ± 1*	68 ± 5*
	Le D6	66 ± 6*	69 ± 6*	71 ± 6*	72 ± 7*

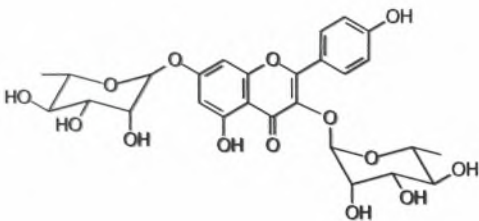
Οι τιμές αποτελούν την μέση τιμή ± SD (τυπική απόκλιση) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα ποσοστά με \* είναι στατιστικά σημαντικά, NA=No Activity

Πίνακας 9: Φαινολικές ενώσεις σε κάθε κλάσμα

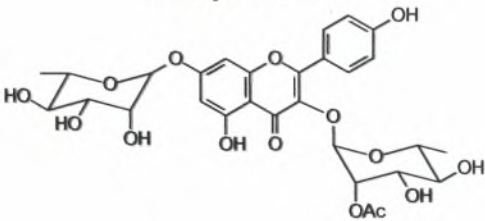
Κλάσμα	Ενώσεις
Le C6	Ισομερή της 11
Le C2	13
Le D3	7
Le D6	12



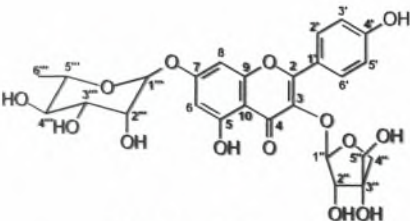
11a ή Le C6



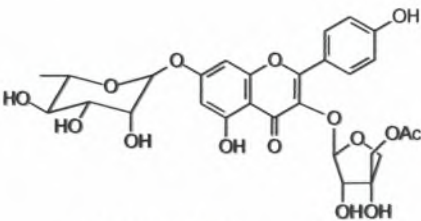
7 ή Le D3



11b ή Le C6



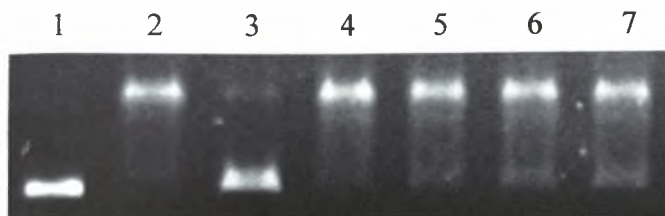
12 ή Le D6



13 ή Le C2

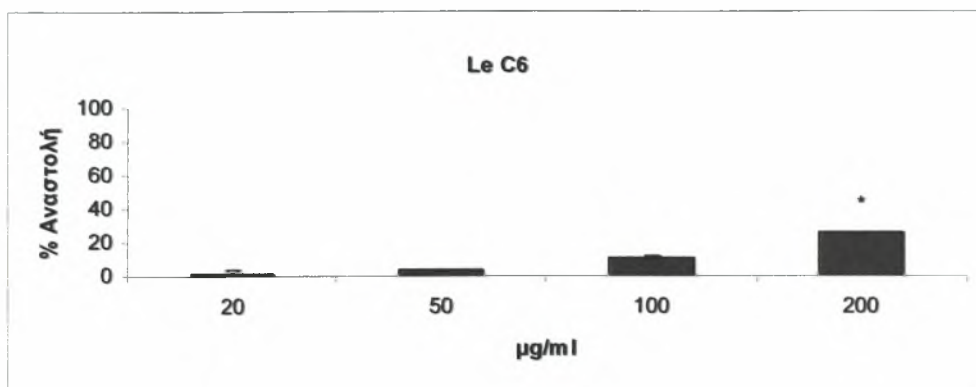
Εικόνα 58: Χημικές δομές μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων

## 1. Le C6



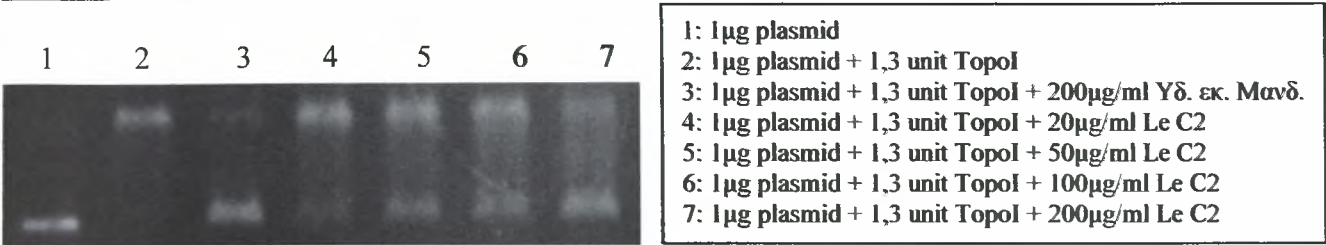
- 1: 1 µg plasmid
- 2: 1 µg plasmid + 1,3 unit TopoI
- 3: 1 µg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200 µg/ml Yδ. εκ. Μανδ.
- 4: 1 µg plasmid + 1,3 unit TopoI + 20 µg/ml Le C6
- 5: 1 µg plasmid + 1,3 unit TopoI + 50 µg/ml Le C6
- 6: 1 µg plasmid + 1,3 unit TopoI + 100 µg/ml Le C6
- 7: 1 µg plasmid + 1,3 unit TopoI + 200 µg/ml Le C6

**Εικόνα 59:** Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου Le C6 στη δράση της τοποϊσομεράσης I

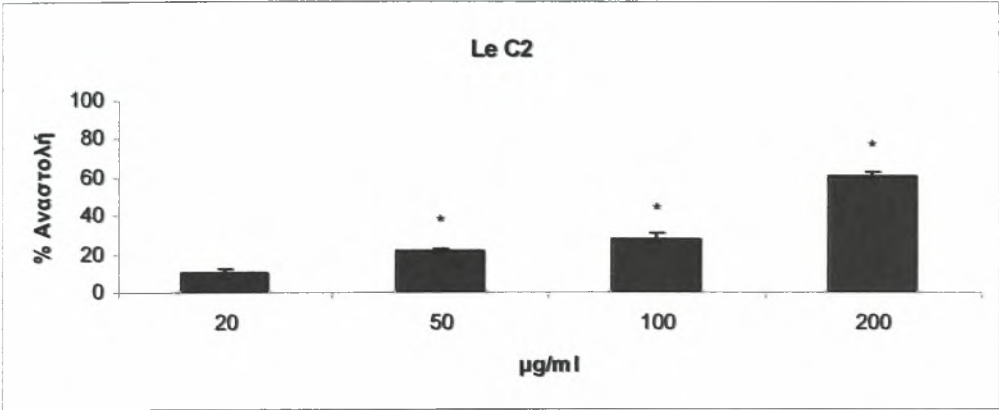


**Γράφημα 15:** Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο Le C6

2. Le C2



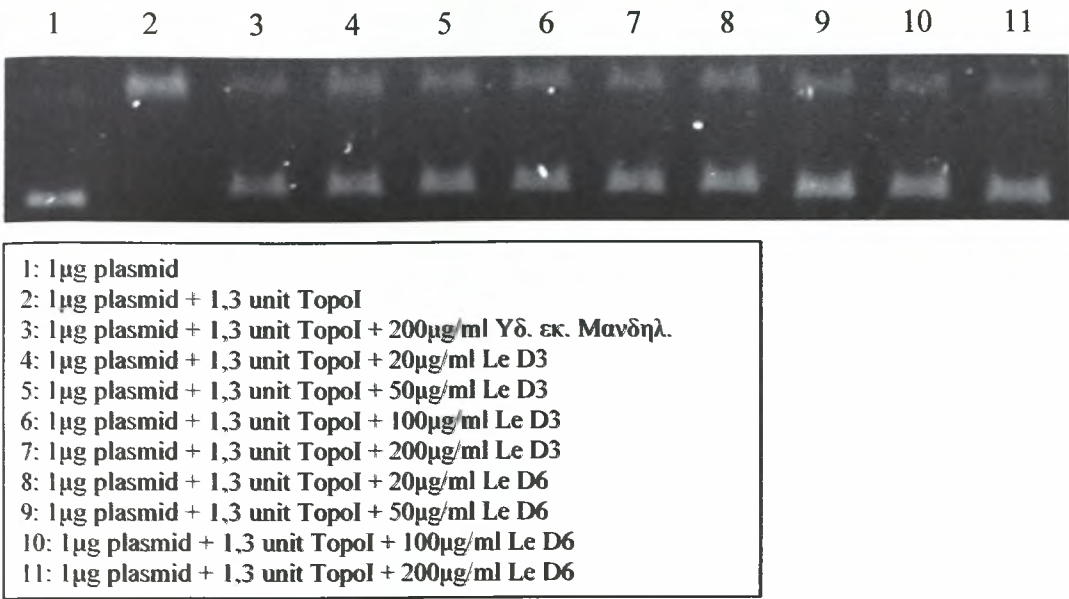
Εικόνα 60: Επίδραση του κλάσματος καθαρού μορίου Le C2 στη δράση της τοποϊσομεράσης I



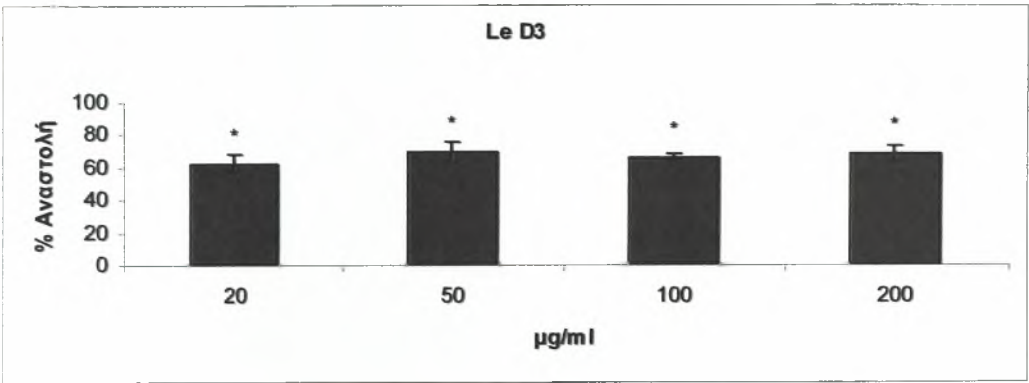
Γράφημα 16: Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο Le C2



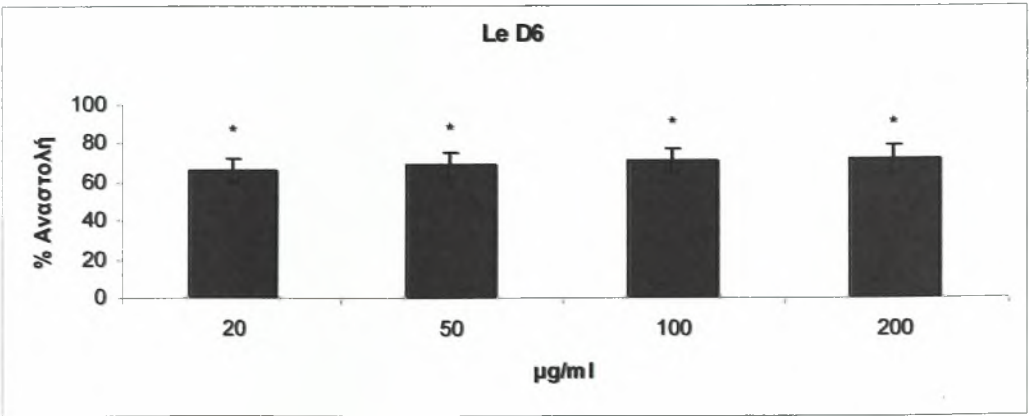
3-4. Le D3 και Le D6



Εικόνα 61: Επίδραση των κλασμάτων καθαρών μορίων Le D3 και Le D6 στη δράση της τοποϊσομεράσης I



Γράφημα 17: Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο Le D3



Γράφημα 18: Ποσοστά αναστολής της δράσης της τοποϊσομεράσης I από το καθαρό μόριο Le D6

#### 4. Συζήτηση

Τα ψυχανθή αποτελούν μία σημαντική κατηγορία δικοτυλήδων φυτών με ποικίλες εφαρμογές. Τα όσπρια, τα οποία αποτελούν τα σπέρματα των ψυχανθών, καταναλώνονται ως τρόφιμα και αποτελούν σημαντικό κομμάτι της ελληνικής και Μεσογειακής διατροφής και περιλαμβάνουν ένα πλήθος θρεπτικών συστατικών ωφέλιμων για την υγεία όπως πρωτεΐνες, ανόργανα στοιχεία όπως Ca, Fe, K, Mg, Zn, ιχνοστοιχεία, φυτικές ίνες και ποικίλες φυτοχημικές ουσίες (Z. Madar, A. Stark, 2002). Μία σημαντική κατηγορία φυτικών ουσιών που εντοπίζονται στα ψυχανθή με ποικίλες θετικές επιδράσεις στην υγεία συνιστούν οι πολυφαινόλες (E. Gonzalez de Mejia et al., 1999). Πιο ειδικά, οι πολυφαινόλικες ουσίες έχει βρεθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην χημειοπροστασία απέναντι στον καρκίνο και έτσι τροφές που τις περιέχουν μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέσω της διατροφής σαν χημειοπροστατευτικοί παράγοντες (C.S. Yang et al., 2001). Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι πολυφαινόλες μπορούν να δρουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες σχετίζονται με τα τρία στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας (έναρξης, προαγωγής και προόδου) (S. De Flora et al., 2005). Παραδείγματα πολυφαινολών που βρίσκονται στα όσπρια και έχει βρεθεί παρουσιάζουν χημειοπροστατευτικές ιδιότητες αποτελούν ισοφλαβόνες όπως η γενιστεΐνη, φλαβονοειδή όπως η κερκετίνη και η καιμπφερόλη καθώς και κάποια φαινολικά οξέα, λιγνάνες και στυλβένια όπως η ρεσβερατρόλη (P.M. Kris-Etherton et al., 2002). Ωστόσο, οι μηχανισμοί με τους οποίους ουσίες που βρίσκονται στα ψυχανθή δρουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες δεν είναι πλήρως γνωστοί. Στα πλαίσια, λοιπόν μελέτης των βιολογικών ιδιοτήτων φυτικών εκχυλισμάτων με έμφαση στις χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν διάφορα φυτικά εκχυλίσματα που προέρχονται από ελληνικά φυτά ψυχανθών της οικογένειας *Leguminosae*. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παρατήρηση της δράσης αυτών των εκχυλισμάτων και κλασμάτων τους πλούσιων σε πολυφαινολικές ενώσεις στη δράση της τοποϊσομεράσης I.

Οι τοποϊσομεράσες αποτελούν ένζυμα σημαντικά για λειτουργίες όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή, η σταθερότητα του γενώματος και η συμπύκνωση και αποσυμπύκνωση της χρωματίνης (J.L.Nitiss, 1998). Έχει βρεθεί ότι οι τοποϊσομεράσες βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα στα καρκινικά κύτταρα και εφόσον συμμετέχουν όπως προαναφέρθηκε σε πολλές σημαντικές διεργασίες αποτελούν στόχο πολλών αντικαρκινικών φαρμάκων και μπορούν να δρουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες (S.J. Froelich-Ammon et al., 1995). Έτσι παράγοντες της διατροφής όπως οι πολυφαινολικές ουσίες που εμφανίζουν επίδραση στις

δράσεις των τοποϊσομεράσεων μπορούν να θεωρηθούν σημαντικοί αντικαρκινικοί παράγοντες (P. Fresco et al., 2006).

Από τα έντεκα υδατικά εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας *Leguminosae* που μελετήθηκαν, επίδραση στην τοποϊσομεράση I εμφάνισαν μόνο τα δύο. Τα εκχυλίσματα αυτά προέρχονταν από την πόα των φυτών *Lathyrus laxiflorus* και *Vicia faba*, με πιο ισχυρό αυτό που προέρχονταν από το φυτό *Lathyrus laxiflorus* (Πίνακας 4). Το υδατικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Lathyrus laxiflorus* παρουσίασε σημαντική ανασταλτική δράση απέναντι στην ικανότητα της τοποϊσομεράσης I να προκαλεί μονόκλωνα σπασίματα, παρουσιάζοντας 23 % αναστολή στην συγκέντρωση 20 µg/ml. Αυξανόμενη της συγκέντρωσης από 20 μέχρι 800 µg/ml το υδατικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Lathyrus laxiflorus* εμφάνιζε αυξανόμενα ποσοστά αναστολής (Πίνακας 4). Αντίστοιχα, το υδατικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Vicia faba* στις χαμηλότερες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, 100 - 400 µg/ml, παρουσίασε ανασταλτική επίδραση στην τοποϊσομεράση I ενώ στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση, 800 µg/ml, εμφάνισε επαγωγική δράση (Πίνακας 4). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι στα εκχυλίσματα των φυτών αυτών υπάρχουν ουσίες οι οποίες έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με το ένζυμο της τοποϊσομεράσης I και να επηρεάζουν την δράση του. Η δράση αυτή μπορεί να αποδοθεί στις περιεχόμενες πολυφαινολικές ουσίες, αφού καθαρές φαινολικές ενώσεις όπως η γενιστεΐνη, η κερκετίνη, η καιμπφερόλη και η λουτεΐνη, που έχουν βρεθεί σε διάφορα ψυχανθή παρουσιάζουν την ικανότητα να επηρεάζουν τη δράση της τοποϊσομεράσης I (R.A. Dixon-D. Ferreira, 2002, C. Baily, 2000, A.R. Chowdhury et al., 2002). Τα διαφορετικά αποτελέσματα που παρατηρούνται στην δράση των εκχυλισμάτων οφείλονται στο ότι τα δύο αυτά ψυχανθή αποτελούν διαφορετικά φυτά και τα εκχυλίσματά τους παρουσιάζουν διαφορετική σύσταση σε δραστικές ουσίες.

Παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα παρουσίασαν στις περισσότερες συγκεντρώσεις ανασταλτική δράση. Στις συγκεντρώσεις αυτές μπορεί να θεωρηθούν ως καταστολείς της δράσης της τοποϊσομεράσης I (H.Wang et al., 1997). Αντίθετα, το γεγονός ότι το υδατικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Vicia faba* στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση 800 µg/ml παρουσίασε επαγωγική δράση, υποδεικνύει διαφορετικό μηχανισμό αλληλεπίδρασης με το ένζυμο. Παράγοντες οι οποίοι επάγουν την δράση των τοποϊσομερασών θεωρούνται ότι δρουν κυρίως σταθεροποιώντας το ομοιοπολικό σύμπλοκο του ενζύμου με το DNA που προκαλεί συνεχόμενα σπασίματα, τα λεγόμενα poisons (M. Lopez-Lazaro et al., 2002). Παρόμοια δράση παρατηρήθηκε να έχει η λουτεΐνη, η οποία σε άλλες συγκεντρώσεις δρα σαν αναστολέας του ενζύμου ενώ σε άλλες επάγει τη δράση του (A.R. Chowdhury et al., 2002).

Όσον αφορά, τα δύο μεθανολικά εκχυλίσματα πόας που μελετήθηκαν από τα φυτά *Vicia faba* και *Lotus edulis* παρατηρήθηκε ότι επηρέαζαν την δράση της τοποϊσομεράσης I στις

μεγαλύτερες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (400 και 800  $\mu\text{g/ml}$ ) (Πίνακας 5). Το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Lotus edulis* εμφάνιζε στατιστικά σημαντική επίδραση στη δράση της τοποϊσομεράσης I μόνο στη μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωση, 800  $\mu\text{g/ml}$ , ενώ το μεθανολικό εκχύλισμα πόας του φυτού *Vicia faba* ανέστειλε την δράση του ενζύμου στις συγκεντρώσεις 400 και 800  $\mu\text{g/ml}$ . Βάσει των αποτελεσμάτων παρατηρείται ότι το μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα από το φυτό *Vicia faba* εμφανίζουν διαφορετική δράση (Πίνακες 4, 5). Αντίστοιχα διαφορετική ήταν και η δράση του υδατικού και του μεθανολικού εκχυλίσματος πόας του φυτού *Lotus edulis*, με το υδατικό εκχύλισμα να μην παρουσιάζει καμία δράση (Πίνακας 4) και το μεθανολικό να παρουσιάζει ανασταλτική δράση (Πίνακας 5). Οι διαφορές αυτές, οφείλονται στην διαφορετική σύσταση των εκχυλισμάτων σε δραστικές ουσίες λόγω της διαφορετικής διαλυτότητας των πολυφαινολικών ενώσεων στη μεθανόλη και στο νερό.

Με σκοπό την μελέτη των δραστικών ουσιών των εκχυλισμάτων, απομονώθηκαν κλάσματα καθαρών μορίων από τα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis*. Τα κλάσματα καθαρών μορίων από το φυτό *Vicia faba* βρέθηκε ότι αποτελούν μείγματα φλαβονοειδών (γλυκοσυλιωμένες μορφές των φλαβονοειδών της κερκετίνης και της καιμπφερόλης) ενώ αυτά από το φυτό *Lotus edulis* αποτελούν μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις, συγκεκριμένα γλυκοσυλιωμένες μορφές της καιμπφερόλης.

Και τα 10 κλάσματα καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό *Vicia faba* παρουσίασαν ανασταλτική επίδραση στην δράση της τοποϊσομεράσης I στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (20, 50, 100 και 200  $\mu\text{g/ml}$ ). Πιο ισχυρά ήταν τα κλάσματα Vfm 155-160, Vfm 6-9, Vfm 13-15, Vfm 25-28 και Vfm 171-176 ενώ τα πιο ασθενή ήταν τα Vfm 92-97, Vfm 135-137 και Vfm 115 (Πίνακας 6). Από τα αποτελέσματα αυτά, προκύπτει ότι τα κλάσματα καθαρών μορίων από το φυτό *Vicia faba* εμφανίζουν διαφορετικές δράσεις. Το γεγονός αυτό οφείλεται στον διαφορετικό συνδυασμό των φλαβονοειδών που βρίσκονται μέσα σε αυτά. Γλυκοσυλιωμένες μορφές της κερκετίνης και της καιμπφερόλης έχει παρατηρηθεί από προηγούμενες μελέτες ότι σε καθαρή μορφή επηρεάζουν την δράση της τοποϊσομεράσης I (Α. Constantinou et al., 1995, M.R. Webb- S. Ebeler, 2004). Αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε αυτά τα φλαβονοειδή που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα μπορεί να είναι υπεύθυνες για τις παρατηρούμενες διαφορές στην δράση τους.

Από τα 4 κλάσματα των καθαρών μορίων που απομονώθηκαν από το φυτό *Lotus edulis* ισχυρότερη επίδραση στην δράση της τοποϊσομεράσης I εμφάνισαν τα Le C2, Le D3 και Le D6 (Πίνακας 8). Το πιο ασθενές κλάσμα Le C6 επηρέαζε την τοποϊσομεράση I μόνο σε συγκέντρωση 200  $\mu\text{g/ml}$  (Πίνακας 8). Τα κλάσματα αυτά αποτελούνται από μεμονωμένες γλυκοσυλιωμένες μορφές της καιμπφερόλης, έτσι οι παρατηρούμενες διαφορές στην δράση



των κλασμάτων είναι πιθανόν να οφείλονται στην διαφορετική τους δομή. Η καιμπερόλη και κάποιες γλυκοσυλιωμένες μορφές της έχει παρατηρηθεί ότι αναστέλλουν την δράση της τοποϊσομεράσης I (A. Constantinou et al., 1995). Έτσι οι πολυφαινολικές αυτές ενώσεις είναι εκείνες που αποτελούν κάποια από τα δραστικά συστατικά του αρχικού εκχυλίσματος από το οποίο προέκυψαν. Ακόμη το γεγονός ότι τα μόρια στα κλάσματα είναι δεν είναι μείγματα τα καθιστά πιθανούς αντικαρκινικούς φαρμακευτικούς παράγοντες. Μόρια όπως η κερκετίνη και η καιμπερόλη, που εντοπίζονται στα κλάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, παρουσιάζουν ανασταλτική επίδραση στην δράση της τοποϊσομεράσης I και είναι γνωστοί αντικαρκινικοί παράγοντες (C. Baily, 2000).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι ενώ τα εκχυλίσματα παρουσίασαν δράση στις συγκεντρώσεις 100-800  $\mu\text{g/ml}$ , τα κλάσματα παρουσίασαν σε συγκεντρώσεις 20-200  $\mu\text{g/ml}$ . Το γεγονός ότι τα κλάσματα είναι πιο ισχυρά από τα εκχυλίσματα, δείχνει ότι αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν ανάμεσα στα φλαβονοειδή μπορεί να επηρεάζουν την δράση τους. Αυτό πιθανόν να οφείλεται επίσης και στην ποικιλομορφία των ενώσεων που υπάρχουν μέσα στα εκχυλίσματα και που μπορεί να επηρεάζουν την δράση των δραστικών τους μορίων. Καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις που απομονώθηκαν από εκχυλίσματα σταφυλιών έχει παρατηρηθεί, ότι παρουσιάζουν διαφορετικές δράσεις σε σχέση με τα αρχικά εκχυλίσματα (D. Stagos et al., 2005). Έτσι προκύπτει ότι πιθανόν τα μόρια όταν βρίσκονται μόνα τους δρουν διαφορετικά από ότι όταν βρίσκονται στο εκχύλισμα καθώς μπορεί να υπάρχουν ουσίες που να παρεμποδίζουν την δράση τους μέσα στα εκχυλίσματα.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται ότι εκχυλίσματα προερχόμενα από τα φυτά *Vicia Faba*, *Lathyrus Laxiflorus* και *Lotus Edulis* παρουσιάζουν ανασταλτική κυρίως επίδραση στη δράση της τοποϊσομεράσης I. Οι ιδιότητες αυτές των εκχυλισμάτων πιθανόν οφείλονται στις περιεχόμενες πολυφαινολικές ενώσεις. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από το ότι κλάσματα που ήταν πλούσια σε πολυφαινόλες και απομονώθηκαν από τα φυτά αυτά επηρέασαν τη δράση της τοποϊσομεράσης I με ανάλογο τρόπο. Έτσι τα εκχυλίσματα αυτών των ψυχανθών που αποτελούν μοναδικές ελληνικές ποικιλίες μπορούν να θεωρηθούν ως σημαντικές πηγές χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Η ικανότητα τόσο των εκχυλισμάτων όσο και των περιεχόμενων δραστικών ουσιών τους να δρουν ως αναστολείς της τοποϊσομεράσης I τα καθιστά ως πιθανούς αντικαρκινικούς παράγοντες, δημιουργώντας μελλοντικές προοπτικές στην χημειοθεραπεία του καρκίνου.



## Βιβλιογραφία

- A. Constantinou, R. Mehta, C. Runyan, K. Rao, A. Vaughan, R. Moon, (1995), Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships, *Journal of Natural Products*, **58**:217-225
- A. R. Chowdhury, S. Sharma, S. Mandal, A. Goswami, S. Mukhopadhyay, H. K. Majumder, (2002), Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I, *Biochemical Society*, **366**:653-661
- A. Scalbert, C. Manach, C. Morand, C. Remesy, (2005), Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45**:287-306
- A. Simopoulos, (2007), The Mediterranean diets: What is so special about the diet of Greece? The scientific evidence, *The Journal of Nutrition*, **22**:3166/01
- A. Webb, M. McCullough, (2005), Dietary lignans: Potential role in cancer prevention, *Nutrition and Cancer*, **51**:117-131
- B. Halliwell, (2001), Free radicals and other reactive species in disease, *Encyclopedia of life sciences*
- B. Montaner, W. Castillo-Avila, M. Martinell, R. Ollinger, J. Aymami, E. Giralt, R. Perez-Tomas, (2005), DNA interaction and dual topoisomerase I and II inhibition properties of the anti-tumor drug prodigiosin, *Toxicological sciences*, **85**:870-879
- B.S. Kurlovich, S.I. Repyev, (1995), The gene bank and breeding of grain legumes, *The N.I Vavilov Institute of Plant Industry*, **111**:438
- Cancer Medicine, Chemotherapeutic Agents, Section 14, 6th Edition
- C. Baily, (2000), Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs, *Current Medicinal Chemistry*, **7**:38-58
- C.S. Yang, J.M. Landau, M. Huang, H. Newmark, (2001), Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, *Annual Review of Nutrition*, **21**:381-406
- D. Stagos, G. Kazantzoglou, P. Magiatis, S. Mitaku, K. Anagnostopoulos, D. Kouretas, (2005), Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA, *International Journal of Molecular Medicine*, **15**:1013-1022
- E. Gonzalez de Mejia, S. Chandra, M. Vinicio Ramirez-Mares, W. Wang, (2006), Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase by phenolic compounds in *Ardisia sompressa* extracts and their effect on human colon cancer cells, *Food and Chemical Toxicology*, **44**:1191-1203

- E. Gonzalez de Mejia, E. Castano-Tostado, G. Loarca-Pina, (1999), Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans, *Mutation Research*, **441**:1-9
- E. Vasilopoulou, K. Georga, M. Bjoerkov Joergensen, A. Naska, A. Trichopoulou, (2005), The antioxidant properties of Greek foods and the flavonoid content of the Mediterranean menu, *Bentham Science Publishers*, **5**:33-45
- F. Boege, T. Straub, A. Kehr, C. Boesenberg, K. Christiansen, A. Andersen, F. Jacob, J. Kohrle, (1996), Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I, *The Journal of Biological Chemistry*, **26**:2262-2270
- G.D. Stoner, M. Morse, G. Kelloff, (1997), Perspective in cancer chemoprevention, *Environmental Health Perspectives*, **105**:945-954
- G. Di Carlo, N. Mascolo, A. Izzo, F. Capasso, (1999), Flavonoids : Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, **4**:337-353
- H. Wang, S. Morris-Natschke, K. Lee, (1997), Recent advances in the discovery and development of topoisomerase inhibitors as antitumor agents, *Medicinal Researches Reviews*, **17**:367-425
- I. Shureiqi, P. Reddy, D. Brenner, (2000), Chemoprevention: general perspectives, *Critical Reviews in Oncology/Hepatology*, **33**:157-167
- I.T. Johnson, (2007), Phytochemicals and cancer, *Proceedings of the Nutrition Society*, **66**:207-215
- J.B. Leppard, J.J. Champoux, (2005), Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles and damage control, *Chromosoma*, **114**:74-85
- J.C. Wang, (1996), DNA topoisomerases, *Annual Reviews of Biochemistry*, **65**:635-692
- J.C. Wang, (2002), Cellular roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective, *Nature Publishing Group*, **3**:430-441
- J.J. Smith, P. Tully, R. Padberg, (2005), Chemoprevention: A primary cancer prevention strategy, *Seminars in Oncology Nursing*, **21**:243-251
- J. Lee, N. Koo, D.B. Min, (2003), Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Society*, **3**:21-33
- J.L. Nitiss, (1998), Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells, *Biochemica et Biophysica Acta*, **1400**:63-81
- L. Le Marchand, (2002), Cancer preventive effects of flavonoids- a review, *Biomed Pharmacother*, **56**:296-301
- L. Reddy, B. Odhav, K.D. Bhoola, (2003), Natural products for cancer prevention: a global perspective, *Pharmacology and Therapeutics*, **99**:1-13
- Mathews and Van Holde, (1995), *Biochemistry*, second edition

- M. Duranti, (2006), Grain legume proteins and nutraceutical properties, *Filoterapia*, **77**:67-82
- M. Lopez-Lazaro, C. Martin-Cordero, M.V. Toro, M.J. Ayuso, (2002), Flavonoids as DNA topoisomerase I poisons, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicine Chemistry*, **17**:25-29
- M. Messina, (1999), Legumes and soy beans: overview of their nutritional profiles and health effects, *American Society for Clinical Nutrition*, **70**:439-450
- M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes, J. Telser, (2004), Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **266**:37-56
- M.R. Webb, S.E. Ebeler, (2004), Comparative analysis of topoisomerase IB inhibition and DNA intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity, *Biochemical Society*, **384**:527-541
- P. Fresco, F. Boeges, C. Diniz, M. Marques, (2006), New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols, *Medicinal Research Reviews*, **26**:747-766
- P.M. Kris-Etherton, K. Hecker, A. Bonanome, S. Coval, A. Binkoski, K. Hilpert, A. Griel, T. Etherton, (2002), Bioactive compounds in foods: Their roles in the prevention of cardiovascular disease and cancer, *Am J Med.*, **113**:71-88
- R.A. Dixon, D. Ferreira, (2002), Genistein, *Phytochemistry*, **60**:205-211
- S. Barnes, B. Boersma, R. Patel, M. Kirk, V.M. Darley-USmar, H. Kim, J. Xu, (2000), Isoflavonoids and chronic disease: Mechanisms of action, *BioFactors*, **12**:209-215
- S. De Flora, L.R. Ferguson, (2005), Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents, *Mutation Research*, **591**:8-15
- S.J. Froelich-Ammon, N. Osheroff, (1995), Topoisomerase poisons: Harnessing the dark side of enzyme mechanism, *The Journal of Biochemical Chemistry*, **270**:21429-21432
- S.N. Nichenametla, T.G. Taruscio, D.L. Barney, J.H. Exon, (2006), A review of the effects and mechanism of polyphenolics in cancer, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **46**:161-183
- S. Watanabe, S. Uesugi, Y. Kikuchi, (2002), Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, gynecological problems and possible immune potentiation, *Biomed Pharmacother*, **56**:302-312
- W.M. Mazur, J.A. Duke, K. Wahala, S. Rasku, H. Adlercreutz, (1998), Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans, *Nutritional Biochemistry*, **9**:193-200

- Y. Fang, S. Yang, G. Wu, (2002), Free radicals, antioxidants, and nutrition, *Nutrition*, **18**:872-879
- Y. Pommier, (1998), Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors, *Biochimie*, **80**:255-270
- Y. Pommier, (1993), DNA topoisomerase I and II in cancer chemopathy: update and perspectives, *Cancer Chemother Pharmacol*, **32**:103-108
- Y. Shukla, S. Kumar Pal, (2004), Dietary cancer chemoprevention: An overview, *Journal of Human Genetics*, **4**:265-276
- Z. Madar, A. Stark, (2002), New legume sources as therapeutic agents, *British Journal of Nutrition*, **88**:287-292
- [www.minagric.gr](http://www.minagric.gr)
- [www.pfaf.org](http://www.pfaf.org)
- [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com)

Παράρτημα

Ονοματολογία φαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα

Αριθμός Ένωσης	Όνομα
1	Quercetin 3- <i>O</i> -rhamnopyranosyl(1→2)-galactopyranoside-7- <i>O</i> -rhamnopyranoside
2	Quercetin 3- <i>O</i> -rhamnopyranosyl(1→2)-glucopyranoside-7- <i>O</i> -rhamnopyranoside
3	9- <i>O</i> -β-D-glycopyranosyloxy-6-hydroxy-3-oxo-α-ionol
4	kaempferol 3- <i>O</i> -rhamnopyranosyl(1→2)-galactopyranoside-7- <i>O</i> -rhamnopyranoside και kaempferol 3- <i>O</i> -rhamnopyranosyl(1→2)-glucoopyranoside-7- <i>O</i> -rhamnopyranoside
5	kaempferol 3- <i>O</i> -galactopyranoside-7- <i>O</i> -rhamnopyranoside
6	Quercetin 3- <i>O</i> -rhamnopyranosyl(1→2)-6- <i>O</i> -acetylgalactopyranoside-7- <i>O</i> - rhamnopyranoside
7	kaempferol 3,7-di- <i>O</i> -rhamnopyranoside
8	kaempferol 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetylglucopyranoside)-7- <i>O</i> -rhamnopyranoside
9	kaempferol 3- <i>O</i> -arabinoside-7- <i>O</i> -rhamnopyranoside
10	kaempferol 3- <i>O</i> -glycopyranoside-7- <i>O</i> -rhamnopyranoside
11	kaempferol 3- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -acetylramnopyranosyl)-7- <i>O</i> -rhamnopyranosyl or kaempferol 3- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -acetylramnopyranosyl)-7- <i>O</i> -rhamnopyranosyl
12	kaempferol 3- <i>O</i> -apiofuranosyl-7- <i>O</i> -rhamnopyranosyl
13	kaempferol 3- <i>O</i> -(5- <i>O</i> -acetylapiosyl)-7- <i>O</i> -rhamnopyranosyl



